Aus dem Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Ludolph Fischer

Die Züchtung der Ruhramoebe (Entamoeba histolytica) in vitro zur Erforschung ihrer Lebensbedingungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rolf Schlagenhauf
aus Frommern/Württ.

1964

7693

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0051

Aus dem Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Ludolph Fischer

Die Züchtung der Ruhramoebe (Entamoeba histolytica) in vitro zur Erforschung ihrer Lebensbedingungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rolf Schlagenhauf
aus Frommern/Württ.

1964

Dekan: Professor Dr. med. Dr. med. dent. Eugen FRÖHLICH

Berichterstatter: Professor dr. med. Ludolph FISCHER

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
EINLEITUNG	1
I. DIE ERNÄHRUNGSANFORDERUNGEN	
A. Nährböden	
Einteilung der Nährböden	3
1) Biphasische Nährböden	
a. Nährböden mit koagoliertem Ei als festem Bestandteil	4
b. Nährböden mit erstarrtem Serum als festem Bestandteil	7
c. Nährboden mit Agar als Grundmasse des festen Bestandteiles	10
2) Monophasische Nährböden	
a. Gewebsextrakte und Serum- bzw. Ei-Nährlösungen	15
b. Synthetische Nährböden	27
3) Tabellen	30-31
B. Reisstärkezusatz und Kohlehydratbedarf	31
C. Wachstumsfaktoren	37
II. PHYSIKO - CHEMISCHE FAKTOREN	
A. Der Einfluß der Temperatur	47
B. Wasserstoffionenkonzentration	52
C. Das Redoxpotential	54
III. DIE BEDEUTUNG DER AMOEBIONTEN IN NÄHRBÖDEN FÜR ENTAMOEBA HISTOLYTICA	
A. Die Bakterienflora	58
B. Bakterien, die das Wachstum von E. histolytica in der Kultur fördern	64
C. Züchtung von E. histolytica mit Hämoflagellaten	69
D. Reinkulturen	71
IV. DISKUSSION	76
ZUSAMMENFASSUNG	85
Literaturverzeichnis	87

E I N L E I T U N G

Die Ruhramoebe , Entamoeba histolytica, ist kosmopolitisch verbreitet. In warmen Ländern ist die Infektionsrate im allgemeinen wesentlich höher als in der gemäßigten Zone. Nach den neuesten Untersuchungen (PATEL, 1962) liegt die Zahl der Amöbenträger in Deutschland etwa bei 1 % der Bevölkerung, sie ist offenbar seit dem Ende des 2. Weltkrieges deutlich zurückgegangen. In einigen tropischen Ländern dagegen können bis zu 50 % der Bewohner und mehr infiziert sein. Eine Ansteckung braucht jedoch keine Krankheitserscheinungen hervorzurufen: In den gemäßigten Zonen wird lediglich eine symptomlose Darmlumeninfektion gefunden. Das klinische Bild der Amoebenruhr kommt dagegen fast nur in tropischen und subtropischen Gebieten zur Entwicklung.

Für das Eindringen von E. histolytica in die Darmwand und die Erzeugung von hämorrhagischen Entzündungen und Nekrosen der Darmschleimhaut - mit dem Symptom der schleimigen blutigen Durchfälle - werden als auslösende Faktoren besondere Umstände verantwortlich gemacht, wie heißes Klima, Abkühlungen, Darmreizungen durch zu fette oder sonstige einseitige (zuviel Kohlehydrate enthaltende) oder verdorbene Kost, durch Alkoholexzesse oder ganz besonders durch infektiöse Darmerkrankungen mit Salmonellen oder Shigellen. Diese begünstigenden Faktoren, auf der klinischen Erfahrung beruhend, die gemeinhin unter dem Begriff der Resistenzminderung aufgeführt werden, geben indes nur vage Hinweise auf das Bild der Pathogenese. Es ergibt sich daraus zunächst einmal die dringende Forderung einer genauen Kenntnis der Physiologie von E. histolytica und ihrer besonderen Ernährungsanforderung als Parasit.

Diese Arbeit gibt eine Übersicht über Kulturmedien und physiologische Studien, die mit Hilfe solcher Medien durchgeführt worden sind. Zunächst werden die gebräuchlichen Kulturverfahren zur Züchtung von E. histolytica beschrieben, um so einen Überblick über die wachsende Zahl der Kulturverfahren und die Ernährungsanforderungen von E. histolytica zu bekommen. Die Arbeiten über das Studium der Physiologie dieser Amöbe sind alle meist neueren Datums, und viele Fragen mußten bisher noch unbeantwortet bleiben. Die bisherigen Veröffentlichungen haben ihr hauptsächliches Interesse

den Wachstumsfaktoren, dem Kohlenhydratbedarf und der Bedeutung der begleitenden Bakterienflora in den E. histolytica- Kulturen gewidmet.

Das Ziel dieser Arbeit ist es also, an Hand der bisher veröffentlichten Untersuchungen Einblick in die Lebensbedingungen von E. histolytica zu erhalten.

I. DIE ERNÄHRUNGSANFORDERUNGEN

A. NÄHRBÖDEN:

Einteilung der Nährböden:

Die Nährböden zur Züchtung von Entamoeba histolytica lassen sich nach ihrem Aufbau in zwei Hauptgruppen einteilen: In biphasische und in monophasische Nährböden.

Der biphasische Nährboden besteht aus einem, im Reagenzglas schräg koaguliertem Bestandteil und einer darübergeschichteten flüssigen Komponente, wobei sich die Amöben an der Grenzfläche zwischen fester und flüssiger Komponente vermehren. Maßgeblich ist dabei nicht die Schräge der Fläche (DODIN,1954), sondern die Größe der Grenzfläche für ein hohes Maß der Diffusion wichtiger Nahrungsbestandteile in die flüssige Komponente.

Der monophasische Nährboden besteht aus einer flüssigen Nährlösung, in der die zur Ernährung der Amöben erforderlichen Bestandteile in gelöster oder suspendierter Form enthalten sind.

Zur besseren Übersicht können diese beiden Hauptgruppen weiter unterteilt werden: So sind in der folgenden Beschreibung der Kulturverfahren die biphasischen Nährböden nach den Hauptbestandteilen der festen Komponente geordnet, während die monophasischen Nährböden nach dem Ausgangsmaterial der suspendierten Nahrungsbestandteile unterteilt werden.

1) Biphasische Nährböden:
   a. Nähböden mit koaguliertem Ei als festem Bestandteil.
   b. Nährböden mit erstarrtem Serum als festem Bestandteil.
   c. Nährböden mit Agar als Grundmasse des festen Bestandteils.

2) Monophasische Nährböden:
   a. Gewebsextrakte und Serum bzw. Ei-Nährlösungen.
   b. Synthetische Nährböden.

1) B i p h a s i s c h e N ä h r b ö d e n :

a. Nährböden mit koaguliertem Ei als festem Bestandteil.

Die erste Kulturmethode, mit der Dauerkulturen von E.histolytica hergestellt werden konnten, wurde von BOECK & DRBOHLAV (1925) beschrieben. In ihren Versuchen über die Züchtung von E. histolytica in der Kultur benützten sie hauptsächlich den "Locke-Ei-Serum"-Nährboden (LES-Nährboden), der zuvor zur Züchtung von Tricercomonas intestinalis (Boeck 1925), Chilomastix mesnili, Trichomonas confusa und Blastocystis hominis entwickelt worden war.

Die feste Komoponente besteht aus einem schräg koagulierten homogenen Gemisch von 4 Hühnereiern in 50 ccm Lockescher Lösung (Menge pro Reagenzglas ca 2,6 ccm).

Überschichtet wird dieser feste Bestandteil mit einer Mischung von 8 Teilen Lockescher Lösung und 1 Teil inaktiviertem menschlichem Serum.

Als eine Variante entwickelten die Autoren den"Locke-Ei-Albumin-Nährboden" (LEA-Nährboden). Statt des menschlichen Serums wird dabei zur Überschichtung der Ei-Schrägnährböden kristallines Ei-Albumin verwendet. Das kristalline Ei-Albumin wird in Lockescher Lösung aufgelöst, wobei der Anteil des Ei-Albumins 1% beträgt.

Zusammensetzung der Lockeschen Lösung:

NaCl	9,0 g	$NaHCO_3$	0,2 g
$CaCl_2$	0,2 g	Glucose	2,5 g
KCl	0,4 g	Aqua dest.	1000 ccm

Das Überimpfen der Amöben im Abstand von 24 Stunden auf jeweils frische Nährböden ermöglicht eine Kulturhaltung auf praktisch unbegrenzte Zeit. Die initiale Reaktion des LES- und LEA-Nährbodens variiert zwischen einem p_H-Wert von 7,2 - 7,8 und bedarf nach Angabe der Autoren keiner Justierung.

Ein Jahr später benützten DOBELL & LAILAW (1926) Pferdeserum statt menschlichem Serum in der flüssigen Komponente des Nährbodens. Außerdem führten sie den Stärkezusatz ein, der nach ihren Ausführungen als Kohlehydratquelle dienen sollte. Sie stellten fest, daß die Amöben im Nährboden nach BOECK-

DRBOHLAV länger lebten, wenn Stärke an Stelle der in der in der Lockeschen Lösung enthaltenen Glucose hinzugefügt wurde.

Die feste Komponente ist ein Ei-Serum Gemisch, wie es von BOECK und DRBOHLAV beschrieben wurde. Statt Lockescher Lösung wird hier jedoch Ringerlösung verwendet.

Die feste Komponente ist ein Gemisch aus Pferdeserum und Ringerlösung im Verhältnis 1:8 .

Zusammensetzung der Ringerlösung:

NaCl	9,0	g	KCl	0,2	g
$CaCl_2$	0,2	g	Aqua dest.	1000	ccm

An Stelle des Pferdeserums verwendeten DOBELL & LAIDLAW (1926) auch Ei-Albumin, jedoch in einer viel stärkeren Konzentration als wie sie von DRBOHLAV angegeben wird. Das Eiweiß von vier Eiern wird dabei mit 1 Liter Ringerlösung vermischt.

Der Vorteil des Nährbodens nach DOBELL & LAIDLAW liegt darin, daß Subkulturen nur alle 6 Tage anefertigt werden müssen.

Als Modifikation der Ei-Schrägnährböden nach DOBELL-LAIDLAW und BOECK-DRBOHLAV wurden mehrere Nähböden beschrieben, die sich ausschließlich durch eine andersartige flüssige Komponente von den Originalnährböden unterscheiden.

So wurde von TSUCHIYA (1932) der Nährboden von BOECK-DRBOHLAV mit einer sterilen Nährbouillon bedeckt, die einen p_H-Wert von 7 justiert und mit einem Zusatz eines Gemisches aus Reisstärke und Tiekohle im Verhältnis 2:1 versehen wurde S-C-Mischung). Eine genaue Beschreibung dieser flüssigen Komponente erfolgt bei den flüssigen Nährböden.

An Stelle des Serums kann auch Blut verwendet werden. KOFOID & Mc NEIL (1936) haben den Ei-Schrägnährboden mit verdünntem Blut überschichtet, wobei die Erythrozyten in einer bestimmte Konzentration eine Wachstumsfördernde Wirkung haben sollen (YAKAMOTO 1937).

Diese Modifikation wird als LEB-Nährboden bezeichnet,

2 ccm defibrinisiertes Kaninchenblut werden mit 500 ccm Lockescher Lösung verdünnt.

Gleich gute Ergebnisse wie bei Verwendung des Pferdeserum-Ringergemisches wurden auch mit einer 0,5%-igen Lösung von

Leberextrakt in physiologischer Kochsalzlösung erzielt. Diese Abwandlung wurde von FRYE & MELENEY (1939) entwickelt, unter der Verwendung eines zur Behandling der perniziösen Anämie gebräuchlichen Handelspräparates: "Lylly's Leberextrakt No.343". Neben einigen praktischen Vorzügen gegenüber dem Pferdeserum, wie der Möglichkeit einer mehrfachen Sterilisation ohne Schädigung, leichter Zubereitung und einer nicht so strengen aseptischen Handhabung, hat der Leberextrakt den großen Vorteil, daß Blastocystis hominis, welcher in dem Pferdeserum- Ringer- Gemisch die Amöben häufig überwuchert, sich in dem Leberextraktnährboden nicht vermehrt. Auch schlugen Versuche, E. coli und Endolimax nana darin zu züchtung fehl.

In einer besonders vorbehandelten Form des LES- Nährbodens hat JACOBS (1947) versucht, E. histolytica ohne Begleitflora zu züchten. Zur Anreicherung des Nährbodens mit eventuell von den Amöben benötigten Stoffwechselprodukten der Bakterien, wurde dieser zunächst mit einem Escherichia coli- Stamm beimpft., welcher nach 24 Stunden Wachstum durch Erhitzen wieder abgetötet wurde. Dem wieder abgekühlten Nähboden wurden Reispuder und zusätzlich ebenfalls durch Erhitzen abgetötete, in Lockescher Lösung suspendierte Bakterien hinzugefügt. Der Nährboden wurde beimpft mit einer E. histolytica- Kultur und mit einer Begleitflora von Clostridium perfringens. Zur Eindämmung der letzteren wurde Penicillin hinzugefügt. Das Wachstum dieser "Reinkultur" konnte nach den Angaben des Autors über Monate aufrechterhalten werden. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß kein hinreichender Beweis erbracht wurde, daß lebende Bakterien sicher nicht vorhanden waren.

Aus diesen Modifikationen, die sich im Prinzip nur in der Form der organischen Substanzen der flüssigen Komponente unterscheiden, hebt sich der Nährboden von REARDON & REES (1939) heraus. Die Schrägnährböden aus koaguliertem Hühnerei wurden hier lediglich mit Lockescher Lösung überschichtet, ohne irgend einen Zusatz ,wie Pferdeserum, Eialbumin u. ä. Bei dem üblichen Reisstärkezusatz konnten in diesem Nährboden vier verschiedene E. histolytica- Stämme mit großen Wachstumsraten gezüchtet werden. Daraus ergibt sich, daß alle von den Amöben benötigten organischen Stoffe in dem Eischrägnährboden enthalten sind.

b. Nährböden mit erstarrtem Serum als festem Bestandteil.

Die Standardform dieser Nöhrbodengruppe liegt in dem viel verwendeten Pferdeserum-Schrägnährboden nach DOBELL & LAIDLAW(1926) vor. Das durch Filtration sterilisierte Pferdeserum wird im schräg gehaltenen Reagenzglas bis zum Erstarren erhitzt (nicht über 80° C.). Zur Überschichtung dient wie bei dem Eischrägnährboden ein Gemisch von Eialbumin und Ringerlösung oder inaktiviertem Pferdeserum und Ringerlösung in dem Verhältnis 1:8. Vor dem Beimpfen wird dann noch Reisstärke hinzugefügt. Zur Erhaltung von E.histolytica über einen längeren Zeitraum müssen Überimpfungen auf neue Röhrchen zumindest alle 6 Tage vorgenommen werden.

Ausgehend von dieser Standardform sind wiederum Nährböden beschrieben worden, die sich durch eine jeweils andere Zusammensetzung der flüssigen Komponente auszeichnen. So zeigten sich verschiedene biologische Flüssigkeiten durch ihren Eiweißgehalt als ausgezeichnet geeignet zur Überschichtung der festen Komponente aus koaguliertem Pferdeserum. DODIN (1954) verwendete die Flüssigkeit aus Vesiculae bzw. Bullae, wie sie von EL KORDY (1954) zur Herstellung eines flüssigen Nährbodens benutzt wurde. Bei der Testung anderer biologischen Flüssigkeiten zeigte sich, daß sich Amnionflüssigkeit, welche von der Kuh gewonnen wurde, mit gutem Erfolg als flüssige Komponente verwenden ließ. (Die Amnionflüssigkeit wurde im Verhältnis 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.)

Bei einer Untersuchung der Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit wurden folgende Bestandteile gefunden:

NaCl	5,2 - 5,5	g/l
Na_3PO_4	1,5	g/l
Serumalbumin	9,2 -10,0	g/l
Mucinalbumin	1,2	g/l
Harnstoff	0,3 - 0,4	g/l
Milchsäure		
Glucose	in Spuren	
Cholesterin		

Da die Amnionflüssigkeit der Kuh eine sehr unterschiedliche Zusammensetzung zeigt, was für eine genaue Untersuchung der Lebensanforderungen von E.histolytica ungünstig ist, wurde eine Ersatzlösung entwickelt in Form eines Gelatinehydrolysates, dessen Zusammensetzung leicht zu bestimmen ist.

Durch Kochen von 15 g Gelatine in 1000 ccm Wasser und einem Zusatz von 10 ccm Ammoniumsulfat entstand ein flüssiges Hydrolysat der Gelatine, welches auf einen p_H-Wert von 7,0 justiert wurde (Neutralisation mit Bariumoxyd).
Die Analyse des flüssigen Gelatinehydrolysats ergab folgende Zusammensetzung:

Gycoll	26,3 g/l	Cystin	0,3 g/l
Alanin	8,0 g/l	Prolin	9,9 g/l
Leucin	3,2 g/l	Hydroxyprolin	9,2 g/l
Isoleucin		Lysin	4,7 g/l
Valin	2,2 g/l	Arginin	16,3 g/l
Phenylalanin	1,9 g/l	Histidin	1,2 g/l
Tyrosin	0,6 g/l	Asparaginsäure	3,6 g/l
Serin	2,5 g/l	Glutaminsäure	5,8 g/l
Threonin	1,5 g/l	Imidazon	3,5 g/l
Methionin	0,4 g/l	Glucose in Spuren	

Das Hydrolysat der Gelatine wurde verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung (0,7 ccm Gelatinehydrolysat in 4,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung) als flüssige Komponente verwendet mit einem Zusatz einer Öse Reisstärke. (Während mit der Flüssigkeit aus Blasen als Hauteffloreszenzen ein Gipfel der Amöbenpopulation nach 24-36 Stunden erreicht wurde, wurde bei Verwendung des Gelatinehydrolysats ein Wachstumsoptimum am 3. Tage beobachtet.)

Eine Überschichtung des Serumschrägnährbodens mit Blut wurde von INOKIS und seinen Mitarbeiterm (1953) angegeben. Unter der Bezeichnung "Ganzblutnährboden No.2" beschrieben sie einen Nährboden, bei dem die feste Komponente aus Löffler-Serum, koguliertem menschlichem Serum oder Pferdeserum (ohne Dextrose) mit menschlichem Blut oder Rattenblut überschichtet wurde. Die Blutgerinnung wurde verhindert durch ein halbstündiges Erhitzen auf 56° C. oder auch durch einen Zusatz von Natriumzitrat.
Eine Besonderheit des "Ganzblutnähbodens No.2" ist die, daß die darin wachsenden Amöben eine größere Widerstandskraft gegenüber niederen Temperaturen entwickeln (Sie leben bei Zimmertemperaturen von 2o°C. 7 Tage, bei 7° C. 10 Tage).

Besondere Bedeutung erlangte die Modifikation des Pferdeserumschrägnährbodens nach PHILLIPS (1950), mit welcher es zum ersten Male gelang, E. histolytica statt mit der üblichen bakteriellen Begleitflora mit Trypanosoma cruzi als Amöbionten zu züchten. Um optimale Wachstumsbedingungen für die Trypanosomen zu schaffen , wurde der festen Komponente aus erstarrtem

Pferdeserum das reduzierende Thioglykolat hinzugefügt. Die Trypanosomen wurden in Reagenzgläsern in einem Nährboden gezüchtet, dessen feste Komponente aus Thioglykolat und Pferdeserum bestand und mit einem NIH-Blutagar (JOHNSON 1947) überschichtet war. Dieser Nährboden, der reichlich Trypanosomen enthielt, wurde beimpft mit Amöben, die in einem flüssigen Thioglykolat-Serum-Nährboden zusammen mit durch Penicillin gehemmten Streptobacillen gewachsen waren. Subkulturen mußten alle 48 Stunden angefertigt werden. Eine weitere wichtige Entdeckung, deren besondere Bedeutung unten noch dargelegt wird, war die, daß die Trypanosomen durch ein 10 Min. langes Erhitzen abgetötet werden konnten, ohne ihren wachstumsfördernden Einfluß auf die Amöben zu verlieren.

Während die meisten Autoren dem Eiweißgehalt der flüssigen Komponente dieser Pferdeserum-Schrägnährböden große Bedeutung beigemessen haben, genügte bei dem von SIMITCH und seinen Mitarbeitern (1955) entwickelten Nährboden eine einfache Salzlösung mit einem Reisstärkezusatz als flüssige Komponente. Mit dem schräg erstarrten Gemisch von 95% Rinderserum und 5% einer 2%-igen Glucoselösung als feste Komponente, erwies sich dieser Nährboden zur Anreicherung der Amöben für diagnostische Zwecke, wie auch zur Herstellung von Dauerkulturen, als ausgezeichnet geeignet.

c. Nährboden mit Agar als Grundmasse des festen Bestandteils.

Die Verwendung von Agar als Grundmasse des festen Bestandteiles der biphasischen E. histolytica-Nährböden wurde von TANABE & CHIBA (1928) eingeführt. Mit einem Zusatz von 0,1% Asparagin als Wachtumsfaktor und der Überschichtung mit einem Serum-Ringer-Gemisch liefert dieser Nährboden ausgezeichnete Wachstumsbedingungen für E. histolytica.

Die feste Komponente enthält: 10 g Agar
1,0 g Asparagin
1000 ccm Aqua dest.

Die flüssige Komponente besteht aus Ringerlösung mit 5% inaktiviertem Kaninchenserum und einer kleinen Menge Reisstärke.

Die Züchtung der Amöben über einen längeren Zeitraum macht ein tägliches Überimpfen erforderlich.

Um den raschen Abfall des p_H-Wertes zu verhindern und um ihn somit in für E.hystolytica günstigen Grenzen zu halten, haben INOKIS und seine Mitarbeiter (1953) die Ringerlösung der flüssigen Komponente durch eine Phosphatpuffersalzlösung setzt, mit dem Ergebnis, daß Überimpfungen immer erst nach 3 - 4 Tagen erforderlich waren.

Während dieser Zusatz des Phosphatpuffers die Ergebnisse gemessen an der Amöbenpopulation jedoch kaum besserte, wurde dagegen ein wesentlich stärkeres Amöbenwachstum beobachtet mit dem "Ganzblutnährboden Nr.1". Dieser wurde hergestellt durch Ersetzen des flüssigen Bestandteils des Nährbodens nach TANABE & CHIBA durch menschliches Blut oder Rattenblut. Die Blutgerinnung wurde verhindert durch ein halbstündiges Erhitzen auf 56° C., oder auch durch einen Zusatz von Natriumcitrat. In diesem Nährboden mußten Subkulturen nur alle 4 Tage angefertigt werden.

Als Zusatz in der festen Komponente liefert Blut ebenfalls gute Wachstumsbedingungen für E. histolytica. So fanden BOECK & DRBOHLAV (1925) beim Testen von physiologischer Kochsalzlösung, Lockescher Lösung, Pferdeserum, Eialbumin, ganzen Eiern und Agar, sowie Blut in allen möglichen Kombinationen, daß sich neben den schon als L.E.S.- und L.E.A.-Medien beschriebenen

Kombinationen auch ein halbfestes Blut-Agar-Gemisch überdeckt mit der Locke-Serum-Mischung zur Züchtung von E. histolyca eignet.

DRBOHLAV (1925) hat E. histolytica auf dem NNN-Blutagar gezüchtet, einem Leishmanien-Nährboden, in dem nicht frisches Blut, sondern durch halbstündiges Erhitzen auf 100°C. vorbehandeltes Blut verwendet wird.

(NNN-Agar: Nährboden nach NOVY und Mc NEAL der von NICOLLE durch Weglassen der Bouillon vereinfacht worden ist. Er besteht aus: Aqua dest. 900 ccm
Agar 14 g
NaCl 6 g
4-5 Teile dieses Agars werden mit 1 Teil Kaninchen-, Hunde- oder Pferdeblut gemischt.)

Neben diesem Blut-AgarNährboden hat der Autor noch zwei weitere Agarschrägnährböden beschrieben, die jeweils 1,4% Agar in Ringerlösung als feste Komponente enthalten. Dieses Agar-Ringer-Gemisch wurde in einem Fall durch Kaliummonophosphat auf einen p_H-Wert von 7,4 gepuffert, während sich der zweite Nährboden durch einen Zusatz von 1 % Stärke zu dem Agar-Ringer-Gemisch auszeichnete.
Als flüssigen Bestandteil aller drei Medien wurde eine Lösung von 1 ccm Eiweiß (Eialbumin) in 500 ccm gepufferter Ringerlösung benützt. Der Vorteil des Eiweißes soll in einem gegenüber dem Serum geringeren Bakterienwachstum liegen.

Mc. QUAY (1957) hat E. histolytika auch in Blutnährböden aus überalterten Blutkonserven gezüchtet. Das Medium ist eine Abwandlung des von TORSHI zur Züchtung von Mycobakterium tuberculosis verwendeten Nährbodens. Wobei die feste Komponente aus einem Blut-Agar-Gemisch besteht, als flüssige Komponente eine einfache, auf einen p_H-Wert von 7,4 gepufferte Salzlösung mit einem Reispuderzusatz benützt wird.

6 g Agar werden in 276 ccm Aqua dest. aufgelöst, 4 ccm Glyzerin hinzugefügt, nach der Sterilisation kommen 4 ccm Penicillin hinzu. Diese sorgfältig durchmischten Bestandteile werden vermischt mit 120 ccm Blut einer 4 Wochen alten Blutkonserve.

Ein Versuch, mit denselben Bestandteilen (mit Ausnahme des Agars) einen flüssigen Nährboden herzustellen, ergab keine befriedigenden Ergebnisse.

In idealer Weise eignet sich auch Agar zur Kombination mit den verschiedensten Gewebsextrakten.

CLEVELAND & COLLIER (1930) verwendeten Leber als Hauptbestandteil der festen Komponente in Form eines Leber-Agar-Aufgusses.

> Der Leber-Agar-Aufguß setzt sich zusammen aus 500 ccm Rinderleber mit 10 g Pepton,5 g NaCl und 2o g Agar.
> Die flüssige Komponente ist eine Mischung von 1 Teil frischem Pferdeserum mit 6 Teilen 0,8 %-iger Kochsalzlösung.
>
> Nach Angabe des Autors ist eine Justierung des p_H-Wertes nicht erforderlich,er liegt entsprechend dem p_H-Wert des Pferdeserums und der physiol. Kochsalzlösung um 7,4.

Die Pufferkapazität des Pferdeserums der flüssigen Komponente dieses Nährbodens,reicht nicht aus um den p_H-Wert über längere Zeit in physiologischen Grenzen zu halten.

CRAIG (1936) fügte daher der flüssigen Komponente statt der physiologischen Kochsalzlösung eine Puffersalzlösung hinzu.Das Mischungsverhältnis des Pferdeserums und der physiologischen Kochsalzlösung betrug 1:10.

> Die Puffersalzlösung besteht aus einem Gemisch von 9,47 g Na_2HPO_4 pro Liter einer 0,85 %-igen NaCl-Lösung und 9,08 g KH_2PO_4 pro Liter physiol. Kochsalzlösung.Wobei der Anteil der Natriumphosphatlösung 82 Teile gegenüber 18 Teilen der Kaliumphosphatlösung beträgt.

Während in dem Originalnährboden der p_H-Wert in 24 Stunden von 8,6 auf 6,6 sank,fiel er in dem selben Zeitraum in dieser Modifikation mit Puffersalzlösung nur von 7,4 auf 7,0 ab.

Zur Kombination des Agarschrägnährbodens mit den verschiedensten Geweben stellte NELSON (1947) Alkoholextrakte aus menschlicher Leber,Kalbsleber,Meerschweinchenleber, Katzendarm und mit gutem Erfolg auch von Eigelb her.

> Die Extraktion erfolgt mit 95%-igem Alkohol. 10 Teile des Gewebes oder Eigelbes werden mit 90 Teilen Alkohol vermischt.Das Gemisch aus fein zerkleinertem Gewebe und Alkohol wird mehrmals am Tage durchgeschüttelt und ist nach 48 Stunden gebrauchsfertig.Der Alkohol wird duch Erhitzen im Wasserbad entfernt.
> 10 ccm des Alkoholextraktes werden nach dem Austreiben des Alkohols ,20 ccm eines 2-%-igen geschmolzenen Agars in 0,5 %-iger gepufferter Salzlösung hinzugefügt.

Als flüssige Komponente diente eine gepufferte 0,5 %-ige Salzlösung.

Beim Beimpfen sollte der p_H-Wert des Nährbodens bei Verwendung von Gewebsextrakt 7,4 sein, bei Verwendung von Eigelbextrakt 7,6. Als Zusatz dient Reisstärke oder Reismehl. (Überimpfungen alle 4-5 Tage)

Ein großer Vorteil dieses Nährbodens besteht darin, daß der im menschlichen Darm häufig vorkommende Hefepilz Blastocystis hominis auf ihm nicht wächst.

In einer späteren Veröffentlichung beschrieb NELSON (1948) einen Nährboden mit einem Zusatz von Lipoiden zu dem Agargrund. Das Lipoidmaterial wurde dabei durch Äther, Aceton oder Alkohol aus Eigelb extrahiert und mit einer heißen Agarlösung vermischt.

Die flüssige Komponete bestand aus einer gepufferten Salzlösung. Während auf diesem Nährboden verschiedene intestinale Amöben, Flagellaten und Ciliaten wachsen, gedeihen Bakterien nur spärlich und Blastocystis hominis überhaupt nicht.

Den gleichzeitigen Zusatz eines Ei- und Leberpräparates zu dem Agar-Grund, beschrieben CAPOCACCIA & CAO-PINNA (1954). Die feste Komponete enthält also die Nährstoffe und Wachstumsfaktoren des Eies und der Leber .

Die überschichtende Flüssigkeit bestand aus einem Ringer-Serum-Gemisch. (6:1)

Ein ganzes Ei und das Eigelb eines zweiten werden mit 15 ccm Lockescher Lösung vermischt.
100 ccm eines 2 %-igen Agars (in einem Aufguß von Herz oder Gehirn) werden nach dem sie sterilisiert und auf 55-60° C. abgekühlt sind, mit dem Ei-Bestandteil vermischt.
Leberextrakt (in einer Menge, die 150 g Leber entspricht) wird hinzugefügt.
Zur Sterilisation und damit die Eikomponente fest wird, werden die Reagenzgläser in einem Eindickapparat eine Stunde lang auf 80° C. erhitzt.

Neben diesen Gewebs-Agarkombinationen eignet sich auch die Agar-Glycerin-Mischung zur Züchtung von E. histolytica. So hat Mc. QUAY (1956) den Holzkohlenährboden, wie er von HIRSCH zur Züchtung von Tuberkelbakterien angewendet wurde, in zwei Formen zur Züchtung von E. histolytica abgewandelt.

Die erste Abwandlung ist ein biphasischer Nährboden, dessen

feste Komponente aus anorganischen Salzen, Baktoasparagin, Glycerin und Holzkohleagar besteht.

$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	3	g
KH_2PO_4	4	g
$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2\ H_2O$	1	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,1	g
$(NH_4)_3Fe(C_6H_5O_7)_2$	0,1	g
Baktoasparagin	5	g
Glyzerin	10	ccm
Aqua destillata	1000	ccm

Nach Auflösen dieser Bestandteile durch Erhitzen, werden noch Bacto - Agar (10 g), "Norite A" (Aktivierte Holzkohle) 1 g , 25 ccm einer 1%-igen Cholesterinlösung in Aceton hinzugefügt.

Dieser Holzkohleagar wird geschmolzen und in Reagenzgläser aufgeteilt, wo er schräg fest wird.

Die flüssige Komponete ist eine 0,5 %-ige Kochsalzlösung. (pH 7,4)

Der zweite Nährboden hat dieselbe Zusammensetzung, nur wird der Agar weggelassen, wodurch ein flüssiger Nährboden entsteht.

2) Monophasische Nährböden:

a. Gewebsextrakte und Serum- bzw. Ei-Nährlösungen:

Mit seinem Serumnährboden leitete CRAIG (1926) die Reihe der flüssigen Nährlösungen ein. Er zeigte, daß das Amöbenwachstum nicht an eine feste Oberfläche gebunden ist.

Als Nährlösung diente einmal ein Gemisch aus einer modifizierten Lockeschen Lösung und Pferdeserum, das durch halbstündiges Erhitzen auf 57°C. inaktiviert worden ist. Auch menschliches Serum sowie Kaninchenserum konnte verwendet werden. (Das Serum sollte nicht über 48 Stunden alt sein). Das Mischungsverhältnis von Lockescher Lösung und Serum betrug 7:1. Der p_H-Wert hielt sich zwischen 7,2 und 8,2 und bedurfte keiner Justierung, wenn Subkulturen alle 24 Stunden angefertigt wurden.

Modifizierte Lockesche Lösung:

NaCl	9,0 g	$NaHCO_3$	0,20 g
$CaCl_2$	0,24 g	Aqua dest.	1000 ccm
KCl	0,42 g	Dextrose	2,5 g

In einer Abwandlung des ersten wurde statt der modifizierten Lockeschen Lösung eine modifizierte Ringerlösung verwendet. (Ringer-Serum-Nährboden)

Modifizierte Ringerlösung:

NaCl	8,0 g	KCl	0,2 g
$CaCl_2$	0,2 g	Aqua dest.	1000 ccm

Als dritte Variation zeigte sich, daß auch eine einfache Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und inaktiviertem menschlichem Serum den Ernährungsanforderungen von E. histolytica genügte. (Physiol. Kochsalz-Serum-Nährboden). Zu einem Teil Serum wurden auch hier 7 Teile der Salzlösung hinzugefügt.

Der Autor gibt an, mit diesem einfachen Nährboden bei täglichen Überimpfungen ein gutes Amöbenwachstum beobachtet zu haben. Er folgert daraus, daß die Bestandteile der Lockeschen Lösung, aber auch Ei-Albumin oder Blut, wie es in der festen Komponente der Schrägnährböden enthalten ist, nicht essentiell für das Wachstum der Amöben seien. Einschränkend muß jedoch bemerkt werden, daß spätere Versuche mit diesem Nährboden nicht die gleichen guten Ergebnisse

zeigten, wie sie von CRAIG angegeben wurden. (NAKAMURA, 1953)

In dem Bestreben, Aufschluß über die im Serum wirksamen Faktoren zu erhalten, um die für das Amöbenwachstum unbedingt erforderlichen Wachstumsfaktoren zu finden, haben DE LAMATER & HALLMAN (1947) einen vereinfachten Nährboden entwickelt, der sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzt:

(a) Einem gepufferten Aufguß von Eiweiß (Hühnerei), hergestellt durch Mischen eines Teiles Eiweiß mit drei Teilen eines n/15 Phosphatpuffers. (p_H 6,8).
(b) Sterile Reisstärke.
(c) Menschliches Serum (filtriert durch "Seitz-Filter").
(d) Proteinfreie Fraktion des Serums. (Wobei die Proteine ausgefällt werden durch eine Säuerung des Serums auf einen p_H-Wert von 5,2 und Erhitzen auf 100°C).
(e) Dialysat der proteinfreien Fraktion hergestellt durch Dialyse mit 2 Volumenanteilen einer 0,9%igen Salzlösung über 24 Stunden.

In den verschiedensten Kombinationen dieser Bestandteile wuchs E. histolytica mit Staphylococcus aureus, Bact. coli, einem Gamma-Streptococcus und einem gramvariablen Bacillus, das nicht identifiziert werden konnte.

Ergebnisse der verschiedenen Kombinationen:

1. Eiweißaufguß und menschliches Serum im Verhältnis 1:10 eignetesich mit einem Reisstärkezusatz für Dauerkulturen.
2. Eiweißaufguß und teilweise deproteinisiertes menschliches Serum im Verhältnis 1:10 eignetesich ebenfalls mit einem Reisstärkezusatz für Dauerkulturen.
3. Eiweißaufguß und vollständig deproteinisiertes menschliches Serum mit Reisstärkezusatz entsprach ebenfalls den Ernährungsanforderungen von E. histolytica. (Mischungsverhältnis 1:10).
4. Eiweißaufguß mit dem Dialysat der proteinfreien Fraktion des menschlichen Serums (1:5) eignetesich mit einem Reisstärkezusatz zur Züchtung von E. histolytica.
5. Eiweißaufguß mit einem Reisstärkezusatz, aber ohne menschliches Serum oder die proteinfreien Fraktion eignetesich dagegen nicht zur Züchtung von E. histolytica.

Diese Experimente beweisen das Vorhandensein einer wachstumsfördernden Substanz im menschlichen Serum, die hitzebeständig (da eine Erhitzung auf 100°C. möglich ist, ohne die wachstumsfördernde Wirkung zu zerstören) und dialysierbar ist.

6. Die teilweise deproteinisierte Fraktion des menschlichen Serums verdünnt mit der gleichen Menge n/15 Phosphatpuffers ergab mit einem Reisstärkezusatz eine ausgezeichnete Nährlösung.

In diesen Versuchen wurde jeweils der NRS-Stamm von E. histolytica gezüchtet.

LUMBRERAS (1959) stellte zur Isolierung und Züchtung der verschiedenen Darmprotozoen ein monophasisches Medium her, das durch die Verwendung von pulverisiertem Pferdeserum sowohl im Laboratorium wie auch bei Felduntersuchungen besonders leicht zu handhaben ist.

0,12 g pulverisiertes Pferdeserum werden in 100 ccm einer mit 5-6% Hühnereiweiß versetzten Ringerlösung aufgelöst.

Das pulverisierte Pferdeserum wird auf folgende Art hergestellt: Das frische Pferdeserum wird in dünner Schicht in Petrischalen ausgegossen und bei einer Temp. von 37-40°C. der Eintrocknung überlassen. Die Trockensubstanz wird in einem Mörser zerrieben und durch eine feine Nylongaze gesiebt. Das so erhaltene hellgelbe Pulver wird nun in sterilen Flaschen in trockener Umgebung (Brutschrank bei 37°C.) bis zum Gebrauch aufgewahrt, oder aber mit den Salzen der Ringerlösung in Glasampullen nach folgendem Rezept abgefüllt:

NaCl	0,765 g	CaCl	0,027 g
KCl	0,0225 g	pulv. Pferdeserum	0,12 g
$NaHCO_3$	0,018 g		

Zum Gebrauch erfolgt die Auflösung in 5-6% wässriger Eiweißlösung.
Zu den 3 - 5 ccm des Mediums in jedem Reagenzglas, werden 0,6 mg suspendierter Reisstärke hinzugefügt. (Die Suspension erfolgt mit dem Medium selbst, in reiner oder mit Eiweiß versetzter Ringerlösung.

Der Nährboden ist besonders zur Anreicherung von Entamoeben geeignet, sowie auch zur Testung von Amoebiciden. Zur Erhaltung von E. histolytica über einen längeren Zeitraum muß eine teilweise Eliminierung des Sediments oder dessen Übertragung auf neue Röhrchen alle 2-3 Tage vorgenommen werden.

Neben dem Serum eignet sich auch ungerinnbar gemachtes Blut zur Herstellung flüssiger E. histolytica-Nährböden.
So haben INOKIS und seine Mitarbeiter (1953) für Versuche mit Medikamenten einen flüssigen Nährboden entwickelt, der aus einer Phosphatpuffersalzlösung und Blut mit einem Zusatz von 0,1% Asparagin besteht. Das Blut wurde durch ein halbstündiges Erhitzen der Flüssigkeit auf 56°C. ungerinnbar gemacht oder auch durch Verwenden von Natriumcitrat statt Natriumchlorid in der Salzlösung. Der Zusatz von Reismehl war unentbehrlich. Die Autoren halten diesen Nährboden als anderen flüssigen Nährböden überlegen.

Zur Herstellung von zur Züchtung von E. histolytica geeigneten Nährbouillons konnten Extrakte der verschiedensten Gewebe verwendet werden.

Das Lebergewebe, das in Form eines Leberextraktes von FRYE & MELENEY (1939) zur Substitution des Pferdeserums als flüssiger Bestandteil des Dobell-Laidlaw-Nährbodens verwendet wurde und von CLEVELAND et al. (1930) in dem Leber-Agar-Aufguß als Haupbestandteil der festen Komponente diente, eignet sich auch zur Herstellung flüssiger Medien.

Einen derartigen flüssigen Lebernährboden beschrieben GRIFFIN & Mc. CARTEN (1949), der sich aus einem Leberaufguß, Rinderserum, Proteose-Pepton und anorganischen Salzen zusammensetzt.

a. Leberaufguß:
(1) 100 g "Bakto-Leber" werden in 500 ccm Wasser gegossen und bei 50°C. eine Stunde lang umgerührt.
(2) Ohne Umrühren wird auf 80°C. erwärmt (10 Min.)
(3) Filterung mit dem Saugfilter, solange das Gemisch heiß ist. Mit destilliertem Wasser wird auf 2000 ccm aufgefüllt.
(4) Zusatz von:

Bacto Proteose-Pepton	10,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	23,9 g
NaCl	10,0 g

Der P_H-Wert sollte dabei um 7,2 liegen. Wenn nicht, muß entsprechend NaOH bzw. HCl zugesetzt werden.
(5) Nach der Sterilisation werden ungefähr 20 g von "Celite Analytical Aid" hinzugefügt und nochmals gefiltert.

b. Puffersalzlösung:

NaCl	4,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	7,8 g
KH_2PO_4	1,6 g
Aqua dest. bis zu	1000,0 g

Dies ergibt einen n/30 Phosphatpuffer in 0,4% NaCl. Die Phosphatmengen müssen so bestimmt werden, daß ein P_H-Wert von 7,4 entsteht.

Dem Gemisch aus a und b werden noch 10% Rinderserum und Reisstärke hinzugefügt.

Überimpfungen müssen in diesem L-S-B-Nährboden (Liver-Serum-Broth) alle 3-5 Tage vorgenommen werden.

Neben einer größeren Menge von Peptonen hat TSUCHIYA (1932) zur Herstellung einer Nährbouillon Rindfleischextrakt verwendet.

Nährbouillon:

Peptone	10,0 g
Rindfleischextrakt	3,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua dest.	1000 ccm

Die Nährbouillon wird auf einen p_H-Wert von 7,0 justiert.

Diese Nährbouillon eignet sich mit dem Zusatz eines Gemisches von Reisstärke und Tierkohle im Verhältnis 2:1 sowohl als flüssiger Nährboden wie auch zum überdecken von Eischrägnährböden (siehe oben). Während die Reisstärke der Reisstärke-Tierkohle-Mischung (S.C.-Mischung) als Kohlehydratquelle dienen soll und das Wachstum von Blastocystis hominis hemmt, wird die Tierkohle benutzt um Ammonium-Verbindungen und Schwefelwasserstoff aus der Kultur zu absorbieren. Das in der Tierkohle enthaltene Kalziumphosphat hilft ferner nach Angabe des Autors mit, die Stoffwechseltätigkeit der Amöben zu stimulieren.
Die Amöben konnten aus Zysten gezüchtet werden. (Überimpfungen waren alle 24-48 Stunden notwendig).

St. JOHN (1932) beschrieb eine Nährbouillon, die durch Kochen eines industriefertigen pulverförmigen Trockenpräparates eines Herzmuskels (hergestellt von der Digestive Ferments Company, Detroit, Michigan) mit einer modifizierten Lockeschen Lösung und Filterung des entstehenden Extraktes hergestellt wurde.

Zusammensetzung der modifizierten Lockeschen Lösung:

NaCl	8,0 g	$MgCl_2$	0,1 g
$CaCl_2$	0,2 g	NaH_2PO_4	0,1 g
KCl	0,2 g	Aqua dest.	1000 ccm

Vor dem Beimpfen wird der Nährlösung noch in kleinen Mengen "Ralston's Vollkornweizenmehl" hinzugefügt. Übertragungen auf Subkulturen sind mit diesem Nährboden nur alle 4-5 Tage erforderlich.

Eine größere Amöbenpopulation wurde erzielt durch einen Zusatz von 1% Pferdeserum (CRAIG, 1953).
Blastocystis hominis und die Darmflagellaten wachsen auf diesem Nährboden nicht.

Eine Nährbouillon die leicht aus Trockenbestandteilen hergestellt werden kann, wurde von HANSEN (1950) beschrieben. Hauptbestandteil dieses Nährbodens ist ein dehydriertes saures Spaltprodukt von Protein: Proteose Pepton (Difco Nr.B 120). Es wurde gewählt wegen seines im Vergleich zu den Peptonen

hohen Gehaltes an Proteosen und sollte die Stickstoffbestandteile hohen Molekulargewichtes, wie sie von den Amöben benötigt werden, liefern. Neben einem Leberpräparat wurde Methionin hinzugefügt, da festgestellt worden war, daß es eine stimulierende Wirkung ausübte. Methionin ist jedoch nicht unbedingt erforderlich. Dagegen ist l-Cysteinhydrochlorid essentiell. Die Wachstumsfördernde Wirkung des Cysteins wird auf die reduzierenden Eingenschaften zurückgeführt, da es durch die oxydative Form Cystin nicht ersetzt werden kann.

Zusammensetzung:

Proteose-Pepton (Difco Nr.B 120)	2,0	g/l
Leber (Wilson Fraktion L)	0,3	
l-Cysteinhydrochlorid	0,1	
Methionin	0,02	
Cholesterol	0,004	
Reispuder	0,4	
NaCl	0,5	
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ sek.Natriumphosphat	1,0	
KH_2PO_4 prim.Kaliumphosphat	0,1	

Der Gehalt an anorganischen Salzen liefert eine beträchtliche Pufferkapazität. Der p_H-Wert, der anfangs zwischen 7,22 - 7,42 liegt, sinkt nach 3-9 Tagen nie unter 6,4.

Ein Zusatz von Serum oder Eigelbaufguß ergab keine Verbesserung des Amöbenwachstums.

Der Autor züchtete den E. histolytica-Stamm 103 zusammen mit einem einzigen Bakterienstamm, dem "Organismus t".

Mit der Annahme,daß der Schleim auf der Oberfläche der Darmwand in der Lage sei, das Wachstum der Amöben zu unterhalten, wurden von verschiedenen Autoren Mucinpräparate zur Herstellung von Nährlösungen verwendet.
Diese Mucin-Nährböden zeichnen sich durch besonders hohe Amöbenpopulationen aus. So gibt KODAMA (1953) an, in einem Mucin-Nährboden mit einem Zusatz von Leberpuder (Modifikation des Mucin-Nährbodens nach HAYASHI & ENOMOTO) das 3-4fache des Amöbenwachstums erzielt zu haben, als vergleichsweise in dem Nährboden nach TANABE & CHIBA u.a..
Anstelle des Leberzusatzes verwendete der Autor auch Ascitesflüssigkeit von Patienten mit einer Lebercirrhose. Die Ascitesflüssigkeit wurde verdünnt mit Ringerlösung, wobei das beste Amöbenwachstum bei einer Albuminkonzentration von

1% beobachtet wurde. Die Amöbenpopulation erreichte ihr Optimum am 3.Tag bei einem p_H-Wert von 7,2 - 7,6.

DOLKART & HALPERN (1958) verwendeten ein puderförmiges Magenschleimpräparat (Wilson Nr. 440), das in Aqua dest. aufgelöst (5 g pro 100 ccm H_2O), nach dem Abzentrifugieren von unlöslichen Teilen, als Stammnährlösung in 2 Nährböden verwendet wurde.

(1) Gemisch aus Magenschleimnährlösung und Balamuth-Eigelbaufguß: 2,5 ccm der mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1% verdünnten Stammlösung werden mit 0,5 ccm von Balamuth's Nährboden vermischt.
(2) Gemisch aus Magenschleimstammlösung und Phosphatpufferlösung: Die Stammlösung wird dabei verdünnt auf 1% mit einer in physiologischer Kochsalzlösung, 15-molaren K_2HPO_4-Lösung oder einer 30-molaren KH_2PO_4-Lösung.

Bei Dauerkulturen muß 3-mal wöchentlich überimpft werden.

Das Hühnereigelb, das in der festen Komponente der biphasischen Nährböden schon mit Erfolg verwendet werden konnte, zeigte sich auch geeignet zur Herstellung flüssiger Nährlösungen:

BALAMUTH & SANDZA (1944) züchteten E. histolytica in einem Aufguß von Hühnereigelb und physiologischer Kochsalzlösung.

Das Eigelb eines hartgekochten Eies wird in 125 ccm einer physiol. Kochsalzlösung zerbröckelt. Durch Kochen wird das Gemisch homogenisiert. Nichtaufgelöste Teile werden abfiltriert, ebenso der bei der Sterilisation entstehende Niederschlag.

Der p_H-Wert wird auf 7,5 justiert. Als Zusatz dient Reisstärke.

Durch den Zusatz eines n/15 Phosphatpuffers (1:1) wurden Überimpfungen spätestens am 9. Tage notwendig, bei einem Maximum der Amöbenpopulation zwischen dem 2.-4. Tage.

An Stelle des frischen Eigelbes verwendete BALAMUTH (1946) auch ein Trocken-Eigelb. Der Vorteil liegt in der einfacheren Zubereitung und gleichbleibend großen Amöbelpolulationen durch die konstantere Zusammensetzung des Industriepräparates.

16 g Trockeneigelb werden in 16 ccm Aqua dest.und 125 ccm einer phyiologischen Kochsalzlösung homogenisiert . Das Gemisch wird 20 Min. im Wasserbad erhitzt. Nachdem das verdampfte Wasser nachgefüllt worden ist, wird das Gemisch durch eine doppelte Lage Musselin-Filter filtriert. Auffüllen bis auf 125 ccm mit 0,8% NaCl-Lösung.Sterilisation im Autoklav. Danach werden 125 ccm einer n/15 Puffersalzlösung hinzugefügt. Justierung des p_H-Wertes auf 7,5.
Als Zusatz dient Reisstärke.

Bei Verwendung des Nährbodens zu diagnostischen Zwecken wurde, um damit in kürzerer Zeit eine hohe Amöbenpopulation zu erreichen, noch Wilson's Leberextrakt hinzugefügt.

Diese Hühnereigelb-Nährböden kommen der Version eines vereinfachten Nährbodens, der ausschließlich die für das Wachstum von E. histolytica unbedingt erforderlichen Substanzen enthält, ziemlich nahe.

Mit dem Ziel, alle von dem Parasiten nicht benötigten Substanzen wegzulassen, entwickelte HARTMAN (1949) einen Nährboden, der ausschließlich Trockeneigelb und Hefeextrakt als Gemisch in physiologischer Kochsalzlösung enthält.

10 g des Trockeneigelbes werden in 200 ccm einer 0,8%-igen NaCl-Lösung fein verteilt, das Gemisch wird nach dem Kochen filtriert (Musselin-Filter), wobei das Filtrat weggeschüttet wird. Das Koagulum wird in 300 ccm einer 5%-igen NaCl-Lösung über Nacht im Kühlschrank abgestellt, erneut gekocht und filtriert. (Musselin-Filter und Papierfilter). Dies gibt eine Ausgangslösung, die mit Wasser bis zu einer Kochsalzkonzentration von 0,8% verdünnt wird. Jedem Reagenzglas werden 0,3 g Hefeextrakt hinzugefügt und mit NaOH auf einen p_H-Wert von 7,2 - 7,4 justiert. Als Zusatz dient Reisstärke.

Neben den verschiedensten Zubereitungen des frischen Hühnereies zu E. histolytica-Nährböden eignen sich auch Extrakte angebrüteter Eier:

Durch das Zerreiben von Hühnerembrionen in Hank'scher Lösung stellten BAERNSTEIN und seine Mitarbeiter (1957) einen homogenisierten Extrakt her, dieser wurde zentrifugiert und die Flüssigkeit wurde abpipettiert und zu gleichen Teilen mit Pferdeserum und Aqua destillata vermischt.

1 ccm der durch Zentrifugation abgetrennten Flüssigkeit des Hühnchenembrionenextraktes
1 ccm Pferdeserum
1 ccm Aqua destillata
pro Reagensglas

Das Pferdeserum konnte teilweise ersetzt werden durch ein Gemisch von Vitaminen.
Es zeigte sich, daß der lösliche Teil des Nährbodens das Wachstum nicht aufrecht erhalten konnte, sondern daß das Vorhandensein kleiner Partikelchen ausschlaggebend war. In welcher Menge diese Teilchen vorhanden waren, hing von der Dauer der Zentrifugation ab. Die wachstumsfördernden Eigenschaften dieser Teilchen konnten durch Erhitzen auf 56°C. zerstört werden. Die Autoren haben diesen Nährboden mit einzelnen, durch Mikromanipulation gewonnenen Amöben beimpft. (Durchschnittliche Wachstumsquote: 11,5 Generationen in 100 Stunden).
Das beste Wachstum wurde bei einem p_H-Wert von 6,2 - 7,9 beobachtet.

Verschiedene biologische Flüssigkeiten eignen sich ebenfalls gut als Nährlösungen zur Züchtung von E. histolytica. So verwendete EL KORDY (1944) aus der Erkenntnis, daß sich E. histolytica in albuminhaltigen Flüssigkeiten züchten lässt, das seröse Exsudat aus Hautefloreszenzen in Form von Vesikulae oder Bullae des Kamels. Mit einem Zusatz einer kleinen Menge Reisstärke soll diese einfache Nährlösung vollauf den Wachstumsanforderungen der Amöben genügen.

SADUN et al. (1952) züchteten E. histolytica in Embrionalflüssigkeit, die sie aus Hühnerembrionen wie auch als Fruchtwasser von der Hündin und vom Menschen in verschiedenen Stadien der Schwangerschaft erhielten.
Die besten Ergebnisse wurden dabei mit Amnion und Allantois-Flüssigkeit aus Hühnerembrionen am 9. - 13. Bebrütungstag, unter anaeroben Bedingungen beobachtet. Die Flüssigkeit konnte bis zu 30 Tagen gelagert werden, ohne die wachstumsfördernden Eigenschaften zu verlieren. Zur Eindämmung der Bakterienflora wurden pro ml der Nährlösung 1000 Einheiten Penicillin G und Streptomycin hinzugefügt. Die Nährlösung gewährleistete höhere Amöbenpopulationen, wenn sie verunreinigt war mit einzelnen

Erythrozyten, oder wenn diese in kleinen Mengen beigefügt wurden.
Die extrem niederen Bakterienpopulationen machen diesen Nährboden zu physiologischen Studien geeignet.

Mit dem Bestreben, Nährböden zu finden, die sich für die bakterienfreie Züchtung von E. histolytica eignen, sind die verschiedensten Zusätze als Substituenten der von den Bakterien gelieferten Faktoren erprobt worden.

SHAFFER, RHYDEN & FRYE (1948) beschrieben eine Nährlösung bestehend aus:

1. der abzentrifugierten Flüssigkeit einer Streptobakterienkultur, die 24 Stunden in einer Thioglykolatnährlösung gezüchtet worden war,
2. Pferdeserum,
3. physiologischer Kochsalzlösung,
4. 500 Einheiten Penicillin um eine Vermehrung der mit dem Zentrifugat übertragenen Streptobakterien zu verhindern,
5. einem bakterienfreien Filtrat einer Kultur der bakteriellen Begleitflora des NRS-Stammes von E. histolytica.

Ein gramnegativer anaerober Streptobacillus wird in einem flüssigen Thioglykolatnährboden, welcher 1% Glucose enthält und 1% Reisstärke, 24 Stunden bei 37°C. bebrütet. Diese Kultur wird dann horizontal abzentrifugiert. (45 Min. bei 2000 U/Min.) Die obenschwimmende Flüssigkeit wird gesammelt und als Grundsubstanz für den Nährboden verwendet. 2,5 ccm dieser Flüssigkeit werden vermischt mit 0,25 ccm Normalpferdeserum, 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung, 500 Einheiten Penicillin und 1,5 ccm eines bakterienfreien Filtrats aus einer Kultur der begleitenden Bakterien des NRS-Stammes von E. histolytica. Der flüssige Teil des Bakteriennährbodens wird dabei wiederum zentrifugiert und durch ein Seitz E.K.-Filter filtriert.

In einer Vereinfachung des Nährbodens von SHAFFER und FRYE verwendeten REEVES et al. (1957) anstelle der abzentrifugierten bakterienhaltigen Flüssigkeit die ganze durch Penicillin gehemmte Streptobakterienkultur als Zusatz.
Ferner wurde als Hauptbestandteil ein von der Industrie geliefertes Fertigpräparat verwendet.

Zusammensetzung des Hauptbestandteiles:

Trypticase (BBL)	20	g/l
Glucose	10	g/l
NaCl	2,5	g/l
K_2HPO_4 (sek.Kaliumphosphat)	2,0	g/l
Thiomalonsäure	1,5	g/l

neutralisiert mit NaOH auf p_H 7,0 (±1)

Vor dem Beimpfen wurde der Nährboden vervollständigt durch einen Zusatz von 0,1-0,5 ccm Pferdeserum (zu jedem Reagenzglas mit 12 ccm Nährlösung),5000 E. Penicillin und einen Reisstärkezusatz.(Von der Streptobacillenkultur wurden 2 ccm verwendet.)

Während SHAFFER (1953) gefunden hatte,daß Trypticase, wie sie gewöhnlich in dem flüssigen BBL-Thioglykolat-Nährboden verwendet wird, das einzige Pepton ist, das in dem S-F-Nährboden eine Vermehrung der Amöben gewährleistet, beschrieben Mc. DADE & SHAFFER (1959) eine Modifikation der S-F-Technik, die es ermöglicht, statt der Trypticase auch andere Peptone zu verwenden. Die Nährlösung besteht aus einem Zystein-Pepton-Glukose Gemisch mit einem durch Penicillin gehemmten anaeroben Bacillus.

Die Bestandteile werden in folgenden Mengen in Aqua dest. aufgelöst:

Pepton	20,0 g/l
Hefeextrakt	10,0 g/l
Dextrose	5,0 g/l
Sek.Natriumphosphat	4,0 g/l
Zystein	0,5 g/l

(p_H-Wert auf 7,2 justiert)

Als Peptone, die in der Lage waren, das Amöbenwachstum zu unterhalten, erwiesen sich: Trypticase, Tryptone und Lactalbuminhydrolysat. Auch Proteose Pepton (Nr.3) war als Substituent geeignet.

Wenn Trypticase (Difco) als Pepton verwendet wurde, wurde der Nährboden mit dem Buchstaben CTG bezeichnet. Die Bezeichnung CLG-Nährboden entspricht der Verwendung von Lactalbuminhydrolysat, und mit Tryptikase als Pepton wurde der Nährboden mit den Buchstaben CTcG signiert.

Technik:
Vor dem Beimpfen mit Amöben werden die Bakterien in dem Nährboden über 24 Stunden bei 37°C. gezüchtet. Danach wird die Nährlösung zentrifugiert und je 2,5 ccm werden mit 0,1 ccm Pferdeserum vermischt. Die Hemmung der Bakterien erfolgt durch den Zusatz von 1000 E. Penicillin in 0,7 ccm Salzlösung.

Nach dem Beimpfen mit Amöben muß jedes Kulturröhrchen mit Paraffin abgedeckt werden. (Es hat sich gezeigt, daß der Sauerstoff auf diesen Nährboden besonders zerstörend wirkt).

Einzelne Kulturröhrchen konnten bis zu 6 Monaten gehalten werden.

Einen verhältnismäßig aufwendigen flüssigen Nährboden entwickelte PAN (1960) zur bakterienfreien Züchtung von E. histolytica mit Hämoflagellaten (bezeichnet als A-TPH-Nährboden).

Der Nährboden setzt sich zusammen aus:

1. Einer Hämoflagellaten-Kultur in einem mit den Buchstaben TPH bezeichneten Flagellaten-Nährboden (7 Tage alte Kulturen von Trypanosoma cruzi, T.lewisi, Leishmania donovani oder L. brasiliensis; 3-7 Tage alte Kulturen von L. enriettii oder 3-4 Tage alte Kulturen von E. schaudini). 2,5 Teile
2. Einer modifizierten flüssigen Enders' Gewebskultur (ENDERS, 1953) 2 Teile
3. Einem mit frischem TPH-Nährboden im Verhältnis 1:3 verdünntem Eigelb-Aufguß 1 Teil

Allen drei Teilen wurden 100 E. Penicillin und 100 mg Streptomycin hinzugefügt.

Zusammensetzung des TPH-Hämoflagellaten-Nährbodens:

a) Trypticase (BBL) 30,0 g
   NaCl 7,0 g
   Na_2CO_3 0,3 g
   Glucose 5,0 g
   aufgelöst in 1000 ccm Aqua dest.
b) 50 ccm Pferdeserum inaktiviert durch ein halbstündiges Erhitzen auf 56°C.
c) 60 ccm haemolysiertes, defibrinogenisiertes Rattenblut (1 Teil in 4 Teilen Aqua dest.)
d) 500 ccm der Enders Gewebekulturflüssigkeit in der Modifiktaion nach WELLER et al. (1958)

Bei allen Amöben-Hämoflagellaten-Kombinationen mußten Subkulturen alle 3-4 Tage angefertigt werden, mit Ausnahme der E. histolytica-T. cruzi-Kombination, die nur einmal wöchentlich überimpft werden mußte.

2) M o n o p h a s i s c h e N ä h r b ö d e n :

b. Synthetische Nährböden:

Während zum Zwecke der Anreicherung und zur Kulturhaltung von E. histolytica über einen längeren Zeitraum die synthetischen Nährböden infolge der höheren Kosten der benötigten Materialien eine geringe Rolle spielen, ermöglichen sie in hervorragender Weise das Studium der Ernährungsanforderungen von E. histolytica.

Zu solchen physiologischen Studien haben HANSEN & ANDERSON (1948) eine Nährlösung entwickelt, die in einer gepufferten Salzlösung 5 Mineralien in Spuren, 12 Aminosäuren, 10 Vitamine des B-Komplexes, Nukleinsäuren und Cholesterin und als einzigen nichtsynthetischen Bestandteil Reisstärke enthält.

Zusammensetzung:

1. Salzlösung:

Na_2HPO_4	1,0 g
KH_2PO_4	0,1 g
NaCl	0,5 g

2. Mineralien

$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	10
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	10
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	125
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	5
$ZnCl_2$	5

3. Aminosäuren:

l (+)	Lysinchlorid	5 mg
l (-)	Histidinchlorid	5 mg
l (-)	Leucin	5 mg
l (-)	Tryptophan	5 mg
l (+)	Argininchlorid	5 mg
l (+)	Zysteinhydrochlorid	5 mg
d l	Isoleucin	10 mg
d l	Methionin	10 mg
d l	Phenylalanin	10 mg
d l	Valin	10 mg
d l	Serin	10 mg
	Glycin	10 mg

4. Vitamine:

Thiamin	20 mg
Riboflavin	40
Ca-Pantothenat	40
Pyridoxin	80
Paraaminobenzoesäure	40
i-Inositol	40
Cholin	80
Biotin	40
Nicotinsäure	40
Lactobacillus casein factor	54

5. Cholesterin 0,2 mg
6. Reisstärke 100 mg
7. Nukleinsäuren 5 mg

Aqua destillata bis auf 100 ccm

Mit diesen Bestandteilen enthielt der Nährboden alle für das Wachstum von E. histolytica notwendigen Substanzen. Die Amöben wurden mit einer monobakteriellen Begleitflora von "Organismus't'" gezüchtet. Zur Erhaltung von E. histolytica über einen längeren Zeitraum mußten Überimpfungen alle 4 Tage vorgenommen werden. Der p_H-Wert lag bei einer 4 Tage alten Kultur zwischen 7,48 und 7,1.

In Substitutionsversuchen wurde gefunden,daß der Leberextrakt,wie er von anderen Autoren verwendet wurde,durch Vitamine des B-Komplexes ersetzt werden konnte.

HALLMAN et al. (1950) verbesserten den Nährboden nach HANSEN und ANDERSON durch einen Zusatz von 8 weiteren Aminosäuren größere Mengen Tryptophan,Cholesterol und Nukleinsäuren.Unter den Mineralien wurden die Magnesium- und Kalziumsalze vermehrt.Die Autoren fanden,daß statt Reispuder auch verschiedene Proteine hinzugefügt werden konnten (siehe Kapitel über die Reisstärke).

Zusammensetzung:

1.Aminosäuren:

l (-)	Asparaginsäure	10 mg
l (+)	Glutaminsäure	18 mg
l (+)	Arginin	5 mg
l (-)	Histidin	5 mg
l (+)	Lysin	5 mg
l (-)	Cystin	6 mg
l (+)	Cystein	5 mg
d l	Methionin	10 mg
d l	Phenylalanin	10 mg
l (-)	Tyrosin	3 mg
l (-)	Tryptophan	11 mg
l (-)	Prolin	10 mg
	Glycin	10 mg
d l	Alamin	10 mg
d l	Serin	10 mg
d l	Threonin	5 mg
d l	Valin	10 mg
l (-)	Leucin	5 mg
d l	Isoleucin	10 mg
d l	Norleucin	10 mg

2.Puffersubstanzen:

Na_2HPO_4	1,130	g
KH_2PO_4	0,272	g
NaCl	0,2	g

3.Lipide:

Cholesterol 10 mg

4.Reispulver:

30-60 mg pro Reagenzglas(bei Verwendung von Reisstärke 5-10 mg pro Reagenzglas)

Als Substitution des Reispuders diente:

(a) Aus dem Reispuder extrahierte Proteine (0,5 ccm wässrige Proteinlösung zu 2 ccm des Nährbodens).

(b) Gereinigtes menschliches Plasmalbumin (0,5 ccm 5,5 % Plasmaalbumin zu 2 ccm des Nährbodens).

(c) Menschliches Serum-Mucoprotein (0,5 ccm 50 mg% wässrige Lösung zu 2 ccm des Nährbodens).

5.Vitamine:

Thiamin	40	i-Inositol	80
Riboflavin	80	Cholin	160
Ca-Pantothenat	80	Folsäure	108
Pyridoxin	160	Biotin	40
Paraaminobenzoesäure	80	Nicotinsäure	80

Mineralien:

$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	125	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1,5 mg
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	5	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	3,5 mg
$ZnCl_2$	5		

Kohlehydrate:

Glucose 40 mg
Glycogen 100 mg

Verschiedenes:

Nukleinsäuren	10 mg	Harnstoff	14 mg
Kreatinin	3 mg	Harnsäure	1,5 mg
Kreatin	2 mg		

Aqua destillata auf 100 ccm

Alle Bestandteile mit Ausnahme der Vitamine werden gemischt und durch Kochen (1-3 Min.) aufgelöst. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, werden die Vitamine hinzugefügt.

Der p_H-Wert wird auf 7,35 justiert.

Zur Testung von 33 Substanzen auf ihre Wachstumsfördernde Wirkung stellten GREENBERG et al. (1955) einen halbsynthetischen Nährboden her, wobei der Grundnährboden aus Eialbumin, anorganischen Salzen, Mineralien in Spuren und Reispuder so gehalten war, daß ohne den Zusatz entsprechender Testsubstanzen eine Züchtung von Amöben über 48 Stunden nicht möglich war.

Grundnährboden:

NaCl	8000	mg/l
KH_2PO_4	450	mg/l
$CaCl_2 \cdot 4\ H_2O$	250	mg/l
$NaHCO_3$	200	mg/l
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	1,25	mg/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,125	mg/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	3	mg/l
$Fe_2(SO_4)_3$	1,25	mg/l
Ei-Albumin	2500	mg/l

Die Testsubstanzen wurden in Mengen von 250 mg pro 75 ccm des Nährbodens hinzugefügt.

Unter den 33 getesteten Substanzen wurden 17 gefunden, die den Grundnährboden für die Züchtung von E. histolytica über einen längeren Zeitraum geeignet machten:

Fumarsäure	1-Amino-2-butanol
Malonsäure	2-Amino-1-butanol
d Glucosamin	4-Amino-1-butanol
Aminoäthanol	4-Amino-1-pentanol
i-Inosamin	Methylamin
Cholin	Dimethylamin
1-Amino-2-Propanol	Äthylamin

Diäthylamin Di-n-propylamin
Triäthylamin

Von den Substanzen,die das Wachstum nicht förderten,seien hier nur dl-Serin und dl-Threonin und i-Inositol aufgeführt, da sie in dem synthetischen Nährboden von HALLMAN et al.(1950) enthalten sind und sich in diesem Versuch als entbehrlich erwiesen.Da jedoch keine Teste mit verschiedenen Konzentrationen dieser aliphatischen Substrate durchgeführt worden sind,bleibt offen,ob die Konzentration in dem von GREENBERG und seinen Mitarbeitern beschriebenen Nährboden immer optimal ist.

Neben seinem biphasischen Holzkohlenährboden beschrieb Mc. QUAY (1956) eine Modifikation,bei der einfach die Agar-Komponente weggelassen wurde,wodurch ein synthetischer flüssiger Nährboden entstand.
Die Zusammensetzung dieses Nährbodens ist äußerst einfach: Anorganische Salze,Baktoasparagin,Glyzerin,Cholesterin und aktivierte Holzkohle genügen in diesem Medium den Ernährungsanforderungen von E. histolytica.

Na_2HPO_4	3	g
KH_2PO_4	4	g
$Na_3C_6H_5O_7.2\ H_2O$	1	g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,1	g
$(NH_4)_4Fe(C_6H_5O_7)_2$	0,1	g
Baktoasparagin	5	g
Glyzerin	10	g
Aqua destillata	10	ccm

auflösen durch Erhitzen.

aktivierte Holzkohle	1	g
1% Cholesterinlösung in Aceton	25	ccm

Autoren	feste Komponete	flüssige Komponente	Zusätze	pH	Subk.	Bemerkungen
BOECK,W.C. & DRBOHLAV,J. 1925	Eigelb + Eiweiß mit Lockescher Lösung koaguliert (4Eier mit 5o ccm Lockescher Lösung)	I. 8 Teile Lockescher Lösung + 1 Teil inaktiviertes menschliches Serum(LES-Nährb.) II. Lockesche Lösung mit 1% Ei-Albumin (kristallin zugesetzt (LEA-Nährboden)	—— ——	7,2 bis 7,8	2 Tage	
HITCHCOCK & RAWSON 1946	Modifikation des BOECK-DRBOHLAV-Nährbodens:Statt frischem Eigelb wird Difco Bacto dehydriertes koaguliertes Eigelb verwendet					
DOBELL,C. & LAIDLAW,P.P. 1926	Ei + Ringerlösung	A) Ei-Albumin + Ringerlösung (4 Eier/1000 ccm Ringerl.) B) inaktiviertes Pferdeserum + Ringerlösung (1:8)	Reisstärke		6 Tage	
FRYE,W.W. & MELENEY,H.E. 1935	Ei + Ringerlösung	Pferdeserum-Ringer-Gemisch	Reismehl			Züchtung im Erlenmeyerkolben
KOFOID & Mc. NEIL	Ei + Lockesche Lösung	Lockesche Lösung (5oo ccm) defibrinisiertes frisches Blut vom Kaninchen (2 ccm) =Locke-Ei-Blut (LEB)-Nährboden				
JACOBS,L. 1947	Nährboden nach BOECK und DRBOHLAV mit: Escherichia coli nach 24 Std. (durch Erhitzen) Züchtung abgetötet +durch Erhitzen abgetötete in Lockescher Lösung suspendierte Bakterien		Reispuder			Keine Vermehrung von Bakterien nachweisbar
TSUCHIYA,H. 1932	Dorsett-Ei-Schrägnährboden	Nährbouillon	Reisstärke + Holzkohle (2:1)	7		
FRYE,W.W. & MELENEY,H.E.	Modifikation des DOBELL-LAIDLAW-Nährbodens	Das Pferdeserum-Ringergemisch wird ersetzt durch eine 0,5%-ige Lösung eines Leberextraktes in physiologischer Kochsalzlösung				Blastocystis hominis wächst nicht
REARDON,L.V. & REES,C.W. 1939	Ei + Lockesche Lösung	Lockesche Lösung	Reisstärke	7,4		

Tab.II

I. B i p h a s i s c h e N ä h r b ö d e n B. Nährböden mit koaguliertem Serum als festem Bestandteil

Autoren	feste Komponente	flüssige Komponente	Zusätze	pH	Subk.	Bemerkungen
DOBELL,C. & LAIDLAW,P.P. 1926	Pferdeserum (schräg erstarrt durch Erhitzen auf 80°C.)	Wie bei Ei-Ringer-Schrägnährboden: A. Ei-Albumin + Ringerlösung B. inaktiviertes + Ringerlösung Pferdeserum (1:8)	Reisstärke	7,4	6 Tage	
INOKIS,S.,TAKADA,S. & NAKABAYASHI,T. 1953	LOEFFLER-Serum bzw.koaguliertes menschliches Serum,Pferdeserum (ohne Dextrose)	menschliches Blut (bzw. Rattenblut) + Natriumcitrat	Reismehl	7,4	7 Tage	
PHILLIPS,B.P. 1950	Thioglykolat-Lösung + Pferdeserum	N I H -Blutagar			2 Tage	
DODIN,A. 1954	koaguliertes Pferdeserum koaguliertes Pferdeserum	Seröses Transsudat Amnionflüssigkeit der Kuh + physiol. Kochsalzlösung (1:5)	Reisstärke Reisstärke		2 Tage	
SIMITCH,T.,PETROVICH,Z. & CHIBALICH,D.(1955)	LOEFFLER-Nährboden	Ringerlösung	Reisstärke			

Tab.III

I. B i p h a s i s c h e N ä h r b ö d e n C. Agar als Grundmasse des festen Bestandteiles

Autoren	feste Komponente	flüssige Komponente	Zusätze	pH	Subk.	Bemerkungen
TANABE,M. & CHIBA,E. 1928	Agar (10 g) Ringerlösung (1000 ccm) Asparagin (1 g)	Ringerlösung mit 5 % Kaninchenserum	Reisstärke	7,4	1 Tg	
INOKIS,S.,TAKADA,S. & NAKABAYASHI,T. 1953	Mod. des TANABE-CHIBA-Nährb. statt der Ringerlösung Phosphatpuffersalzlösung	Ringerlösung mit 5 % Kaninchenserum oder menschliches Blut (bzw.Rattenblut) + Natriumcitrat	Reismehl		4 Tage	
DRBOHLAV,L. 1925	A. Agar + Ringerlösung B. Agar + 1 % Stärke C. NNN-Agar (Agar + Blut,4:1)	Ringerlösung mit 0,2 % Ei-Albumin	———	7,4	24 Std.	
Mc. QUAY,R.M. 1957	Agar Glyzerin Penicillin überalterte Blutkonserven	gepufferte Salzlösung	Reispuder	7,4	3-4 Tge	
CLEVELAND,L.R.& COLLIER,J. 1930	Leber-Agar-Aufguß	Pferdeserum mit physiol. Kochsalzlösung (1:6)	Reismehl	7,4	2 Tge	
NELSON,E.C. 1947	Alkohol-Extraktnährboden A.Alkoholextrakt eines Gewebes + Agar B.Alkoholextrakt aus Eigelb + Agar	gepufferte,0,5 %ige Salzlösung	Reisstärke Reismehl	7,4 bis 7,6	4-5 Tge	Blastocystis hominis wächst nicht
NELSON,E.C. 1948	Agar + Lipoide	gepufferte 0,5 %ige Salzlösung	Reisstärke	7,4 bis 7,6	4-5 Tge	
CAPOCACCIA,L. & CAO-PINNA,M. 1954	Agar + Ei + Leberextrakt	Ringerlösung + Serum (6:1)	Reisstärke	7,4	2 Tage	
Mc. QUAY,R.M.1956	Modifikation des Holzkohle-Nährbodens nach HIRSCH: Holzkohleagar + anorgan. Salze + Baktoasparagin +Glyzerin	gepufferte 0,5 %ige Salzlösung	Reispuder	7,4	3 Tge	E.coli,Endolimax nana, Jodamöba bütschlii, Dientamöba fragilis, Trichomonas hominis wachsen nicht

Autor	Nährboden	Zusätze	pH	Subk.	Bemerkungen
CRAIG,C.F.(1926)	I. Locke-Serum-Nährboden: Gemisch aus inaktiviertem Pferdeserum (Menschen-Kaninchenserum) und modifizierter Lockescher Lösung (1:7). II. Ringer-Serum-Nährboden: inaktiviertes Pferdeserum + Ringerlösung (1:7). III. Physiol.Kochsalz-Serum Nährboden: inaktiviertes Pferdeserum + physiologische Kochsalzlösung (1:7).	0,25 % Dextrose	7,2 bis 8,2	1Tg.	
DE LAMATER,J,N. & HALLMAN,F.A. (1947)	I. Eiweißaufguß + menschliches Serum (1:10) II. Eiweißaufguß + teilweise deproteinisiertes menschl.Serum III. teilweise deproteinisiertes menschliches Serum verdünnt mit n/15 Phosphatpuffer.	Reisstärke	7,4	2Tge	
LUMBRERAS,H. (1959)	Pulverisiertes Pferdeserum gelöst in mit 5% Eiweiß versetzter Ringerlösung (0,12 g Pferdeserum auf 100 ccm Ringerlösung)	suspendierte Reisstärke	7,4	2-3 Tge	
INOKIS,S.,TAKADA, S.&NAKABAYASHI,T. (1953)	Mit einer Phospatpuffersalzlösung verdünntes Blut und einem Zusatz von Asparagin	Reismehl	7,4	3 Tge	
GRIFFIN,A.M.& Mc CARTEN,W.G. (1949)	Leberaufgußnähboden mit Proteose-Pepton,Reisstärke,anorgan. Salzen und 10% Rinderserum (=LSB-Nährboden)	Reisstärke	7,4	3-5 Tge	
TSUCHIYA,H.(1932)	Sterile Nährbouillon aus Peptonen und Rindfleischextrakt	Reisstärke + Tierkohle (2:1)	7,0	1-2 Tge	andere Amöben zeigen kein oder nur geringes Wachstum
St.JOHN,J.H.(1932)	Extrakt eines pulverförmigen Herzmuskelpräparates mit Lockescher Lösung (1 g Herzmuskelpulver + 1000 ccm mod. Lockesche Lösung)	"Ralston's Vollkorn-Weizenmehl		4-5 Tge	Blastocystis hominis wächst nicht
HANSEN,E.L. (1950)	Zubereitung aus Trockenbestandteilen: Proteose Pepton — NaCl Leberpulver — Sek.Natriumphosphat Methionin — Prim. Kaliumphosphat Cholesterin	Reispuder	6,4 bis 7,4	5-9 Tge	
KODAMA,T.(1953)	Mucinnährboden mit a) tierischem Leberpuder b) Ascitesflüssigkeit(verdünnt mit Ringerlösung bis zu einer Albuminkonzentration von 1%)		7,2 bis 7,6	5-5 Tge	
DOLKART,R.E. & HALPERN,B.(1958)	Magenschleim-Nährboden: Die Stammnährlösung besteht aus einer abzentrifugierten Flüssigkeit eines in Aqua dest. aufgelösten pulverförmigen Magenschleim Präparates dazu kommt a) physiologische Kochsalzlösung bis zu einer Verdünnung von 1% + Balamuth-Eiaufguß (1:5) b) n/15 bzw. n/30 K_2HPO_4 bzw. KH_2PO_4 in physiol. Kochsalzlösung bis zu einer Verdünnung von 1% der Stammlösung.		7,4	2 Tge	
BALAMUTH,W. & SANDZA,J.G. (1944) (1946)	Eigelbaufguß: 1 Eigelb(hart gekocht) fein vermischt mit 125cm³ physiol.Kochsalzlösung Vereinfachung durch die Verwendung von Trockeneigelb	Reisstärke	7,5	7-9 Tge	
HARTMAN,E. 61949)	Handelsübliches Trockeneigelb mit Hefeextrakt gelöst in physiologischer Kochsalzlösung	Reisstärke	7,2 bis 7,4		
BAERNSTEIN,H.D.; REES,C.W. & BARTGIS,I.L. (1957)	Zellfreier Nährboden aus Hühnerembrionen: abzentrifugierte Flüssigkeit eines Gemisches in Hankscher Lösung fein zerkleinerter Hühnerembrionen werden gemischt mit Pferdeserum und Aqua destillata.		6,2 bis 7,9		

II. Monophasische Nährböden A. Gewebsextrakte und Serum- bzw. Einährlösungen

Autor	Nährböden	Zusätze	pH	Subk.	Bemerkungen
EL KORDY, M.I. (1944)	Seröses Exsudat	Reisstärke			
SADUN, E.H., KRUPP, I.M. & EVERRIT, M.G. (1952)	Embrionalflüssigkeit a) aus Hühnerembrionen b) Fruchtwasser von Hündinnen c) Fruchtwasser vom Menschen				
SHAFFER, J.G., RYDEN, F.M. & FRYE, W.W. (1948)	Abzentrifugierte 24 stündige Thioglykolatkultur eines Strep=tobacillus.(2,5 ccm) + 0,25 ccm Normal-Pferdeserum + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung + 500 Einheiten Penicillin + 1,5 ccm eines bakterienfreien Filtrats einer Kultur der bakteriellen Begleitflora des NRS-Stammes von E.histolytica	1%Glucose 1%Reis=stärke	7,4	1-2 Tge	Kein nach=weisbares Bakterien=wachstum
REEVES, R.E., MELENEY, H.E. & FRYE, W.W. (1957)	Statt der abzentrifugierten bakterienhaltigen Flüssigkeit des S.-F.-Nährbodens wird hier eine durch Penicillin gehemmte Streptobacillenkultur oder gewaschene Bacillen hinzugefügt. Zusammensetzung: enzymatisches Verdauungsprodukt von Casein + Glucose + anorganische Salze + Pferdeserum + Penicillin	Reisstärke	7	2 Tge	
Mc DADE, J.J. & SHAFFER, J.G. (1959)	Modifikation des S.-F.-Nährbodens in Form eines Zystein-Pepton-Glucose-Gemisches	Reisstärke	7,2		
PAN, CH.T. (1960)	"A-TPH-Nährboden": setzt sich zusammen aus: (1) TPH-Hämoflagellatennährboden (2) modifizierte flüssige Enders'Gewebe=kultur (3) Eigelbaufguß verdünnt mit TPH-Nährboden	Reisstärke		3-4 Tge	

Tab. VI

II. Monophasische Nährböden B. Synthetische Nährböden

Autor	anorganische Bestandteile	organische Bestandteile	Zusätze	pH	Subk.	Bemerkungen
HANSEN, E.L. & ANDERSON, H.H. 1948	gepufferte Salzlösung mit Mineralien in Spuren	12 Aminosäuren Nukleinsäuren Cholesterin 10 synthetische Vitamine des B-Komplexes	Reisstärke	7,1 bis 7,48	4 Tge	
HALLMAN, F.A., MICHAELSON, J.B.& DE LAMATER, (1950)	Abwandlung des Nährbodens nach HANSEN & ANDERSON: Magnesium und Calzium vermehrt	zusätzlich 8 weitere Amino=säuren, größere Mengen von Tryptophan u. Cholesterin u. der Nukleinsäuren, sowie Zu=satz von menschl. Plasmaalbumin und Serummucoprotein	statt Reisstärke Glucose u. Glycogen	7,35		
GREENBERG, J., TAYLOR, D.J. & BOND, H.W. (1955)	Grundnährboden aus anor=ganischen Salzen	Eialbumin (2500 mg/l)	Reisstärke	7,1 bis 7,3		
	In diesem Grundnährboden wurde das Wachstum der Amöben nur durch den Zusatz folgender Testsubstanzen ermöglicht: aliphatische Amine sekundäre u. tertiäre Amine (mit 1-6 C-Atomen) Fumarsäure Polyhydroxamine					
Mc QUAY, R.M. (1956)	Abwandlung des Holzkohlenährbodens nach HIRSCH: Sek. Natriumphosphat prim. Kaliumphosphat Natriumcitrat Magnesiumsulfat Triammoniumferrodicitrat Aqua destillata	Baktoasparagin Baktotryptone Glyzerin	Reispuder	7,4		E.coli, Endo limax nana, Jodamoeba bütschlii, Dientamöba fragilis, Trichomonas hominis wachsen schlecht
	Aktivierte Holzkohle (1g) + 25 ccm 1%-ige Acetonlösung in Cholesterin					

B. REISSTÄRKEZUSATZ UND KOHLEHYDRATBEDARF

Es ist heute allgemein üblich, den E. histolytica-Nährböden Stärke hinzuzufügen. Dieser Stärkezusatz wurde eingeführt durch DOBELL & LAIDLAW (1926), die festgestellt hatten, daß die Amöben in dem Boeck-Drbohlav-Nährboden länger lebten mit Stärke als mit der erst verwendeten Glucose. Der offensichtliche Nachteil der Glucose liegt in dem raschen fermentativen Abbau durch die Bakterien, was eine Säuerung des Nährbodens und somit auch eine Hemmung des Amöbenwachstums bewirkt. Bei der Untersuchung von 12 verschiedenen Stärkearten fanden die Autoren, daß die Reisstärke sich am besten eignet. Interessant ist, daß zwar ein verbessertes Wachstum erreicht wurde, die Amöben aber bei längerer Züchtung auf dem mit Reisstärke angereichtertem Boeck-Drobhlav-Nährboden ihre Pathogenität verloren. REES (1928) fand, daß die Amöben bei Stärkezusatz träger wurden.

Es erhebt sich nun die Frage, worauf die wachstumsfördernde Wirkung der Reisstärke in den E. histolytica-Nährböden beruht. Einmal könnte sie als Kohlehydratquelle dienen, zum andern enthält sie aber auch Proteine und Vitamine, auf die eine wachstumsförderne Wirkung zurückgeführt werden könnte.

In ihrem teilweise synthetischen Nährboden ersetzten HANSEN et al. (1948) die Reisstärke durch andere Kohlehydrate, was eine ausschreitende Säurebildung zur Folge hatte. Sie nahmen an, daß neben der Funktion als Kohlehydratquelle, die Stärke als Adsorptionsmittel für andere Bestandteile in dem flüssigen Nährboden diene. Substitutionsversuche mit anderen Adsorptionsmitteln führten jedoch nicht zum Erfolg. Die Stärkekörner wurden von den Amöben phagozytiert, nachdem sie vorher zu kleineren Bestandteilen aufgelöst worden waren. Bei der Untersuchung, ob die bakterielle Begleitflora für diese fermentativen Prozesse verantwortlich sei, zeigte sich, daß die Auflösung nur in Anwesenheit der Protozoen stattfand und durch den begleitenden Organismus't' allein nicht bewirkt wurde.

Da in Nährböden ohne Reisstärkezusatz die Bakterien rasch überhand nahmen, schrieben DE LAMATER & HALLMAN (1947) der Reisstärke einen gewissen hemmenden Einfluß auf die Vermehrung der Bakterien zu.

HOPKINS & WARNER (1946) boten den Amöben Reisstärkekörner, Bakterien, Fettkügelchen und Hefe zur Phagozytose an. Sie geben an, Reisstärkekörner verfolgt zu haben, wie sie aus der Nährlösung von den Amöben einverleibt und vollständig verdaut wurden, wobei einzelne Abfallstoffe wieder ausgeschieden wurden. Dabei zeigten die Amöben ein beträchtliches Auswahlvermögen in den Nahrungsstoffen, indem sie einige Stärkekörner berührten, ohne sie sich einzuverleiben, andere dagegen sogleich phagozytierten.

HALLMAN et al. (1950) substituierten den Reispuder in ihrem synthetischen Grundnährboden durch Proteine verschiedener chemischer Struktur und verschiedener Größe. Proteine, die aus dem Reispuder extrahiert wurden, konnten diesen ersetzen. Es zeigte sich, daß das Molekulargewicht und eine gewisse Kompliziertheit der Struktur maßgebliche Faktoren waren. Ovalbumin war dabei mit einem Molekulargewicht von 40 000 das kleinste Protein, das mit Erfolg verwendet wurde. Gelatine, Peptone und Peptide schienen unzulängliche Substituenten zu sein.

MICHAELSON et al. (1953) verglichen die wachstumsfördernden Eigenschaften von fein zermahlener Reisstärke und Reispuder oder Reismehl. Dabei fanden sie, daß der Reispuder meist die Bildung der doppelten Zahl an Amöben bewirkte als die reine Reisstärke, wenn sie in Mengen von 50 mg einem Nährboden hinzugefügt wurden, der aus dem Filtrat eines durch Erhitzen koagulierten Serums bestand. Um die Faktoren, die für diese Unterschiede verantwortlich waren, zu identifizieren, wurden beide Substanzen detaillierten Analysen unterzogen. Dabei wurde gefunden, daß der Reispuder eine höhere Konzentration leicht wasserlöslicher Kohlehydrate enthielt, ungefähr 7-mal mehr Lipide und Fettsäuren und 5 bis 6-mal mehr Stickstoffverbindungen als die Reisstärke. Dazu erwies sich der Reispuder als eine reichlichere Quelle wasser und fettlöslicher Vitamine und besaß einen höheren Gehalt an anorganischen Salzen als die Stärke.

NELSON & JONES (1955) testeten Reisprodukte in Form von Reiskleie, Reisschliff, poliertem und unpoliertem Reismehl und reiner Reisstärke. Der Grundnährboden, dem diese Testsubstanzen hinzugefügt wurden, war ein einfacher Agarnährboden mit Magnesiumsulfat ohne irgend welche andere Nährstoffe, der mit einer Phosphatpuffersalzlösung überschichtet wurde. Die Amöben wurden darin zusammen mit einer bakteriellen Mischflora gezüchtet. Bei diesen Versuchen konnte Reiskleie das Wachstum der E. histolytica-Kulturen nicht aufrecht erhalten. Mit Reisschliff und reiner Reisstärke konnte ein gutes Wachstum nur für kurze Zeit erzielt werden, während Reismehl aus poliertem wie auch aus unpoliertem Reis alle erforderlichen Substanzen enthielt, um den Nährboden für eine Züchtung von E. histolytica über einen längeren Zeitraum geeignet zu machen.

Die Frage der fermentativen Leistung der Amöben bei dem Abbau der Stärkekörner wurde von HALMANN & LAMATER (1953) untersucht. Zu diesem Zwecke wurde dem "Bacto-Blut-Agar-Grund" in der Petrischale 0,3% "Difco's lösliche Stärke" hinzugefügt. In die abgekühlte Platte wurden sterile Porzellanzylinder gesteckt und darin Mikrokulturen von Entamoeba histolytica angelegt. Zur Hemmung des Bakterienwachstums wurden die Amöben mit Antibiotika in die Porzellanzylinder übertragen. Von der begleitenden Flora eines jeden Stammes wurden Kontrollkulturen angefertigt, ebenfalls in solchen Zylindern. Die Zylinder wurden abgedeckt und die Petrischalen 48 Stunden bei 37°C. im Brutschrank gehalten. Danach wurden die Zylinder aus den Petrischalen entfernt und die Agarplatten mit Jodlösung überspült. Die Hydrolyse der Stärke wurde nachgewiesen durch einen klaren Hof, der sich jeweils um die Stelle der Kultur bildete, während sich der Rest der Platte in Folge der Jod-Stärkereaktion blau anfärbte. Während alle Stämme von E. histolytica, die in diesem Experiment getestet wurden, eine Hydrolyse der Stärke zeigten, veränderten die bakteriellen Kontrollkulturen die Platte nicht. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die von den Amöben gebildeten Fermente in das feste Medium diffundieren. Eine genaue Analyse dieser Fermente wurde von HILKER et al.

(1957) durchgeführt. Mit einer chromatographischen Methode haben diese Autoren bei drei Stämmen von E. histolytica das Vorhandensein einer Amylase und einer Maltase nachgewiesen. Nicht nachgewiesen werden konnten in den lyophilisierten Amöbenpräparaten Saccharase und Laktase.

Die Bedeutung der Glucose im Kohlehydratstoffwechsel von E. histolytica ist verschieden beurteilt worden. NAKAMURA et al. (1953) berichten über die Bildung von Säure und Gas in E. histolytica-Nährböden, die Glucose enthielten, wobei die fermentative Tätigkeit der Bakterien durch einen Penicillin- und Streptomycin-Zusatz ausgeschaltet worden war. BECKER et al. (1955) haben den Weg der C-markierten Glucose verfolgt, einmal in Kulturen von E. histolytica mit einer gemischten Bakterienflora, dann in einer reinen Bakterienkultur. Sie verglichen dabei die Menge des markierten CO_2 und Glykogens, das jeweils gebildet wurde. In den Kontrollkulturen ohne Amöben, also in den reinen Bakterienkulturen, wurde kein Glykogen gebildet. Aus den Messungen der CO_2-Aktivität und aus der Glykogenanalyse wurde gefolgert, daß die extrazelluläre Glucose von E. histolytica verwendet wird. HALLMAN et al. (1954) dagegen kamen bei der Untersuchung des Glucosebedarfs von E. histolytica zu dem Schluß, daß zumindest der von ihnen getestete Stamm keine Glucose verbraucht. LORAN et al. (1956) betonen ebenfalls, das E. histolytica keine Glucose benötigt, jedoch Produkte des Glucosestoffwechsels der begleitenden Bakterien. Versuche von ENTNER & HALLMAN (1955) mit C_{14}-markierten Kohlehydraten, die E. histolytica in der bakterienfreien Kultur angeboten wurden, erbrachten keinen eindeutigen Beweis des Glucosebedarfs. Die Maltose schien dagegen abgebaut zu werden.

Auch der Weg über die zytochemische Untersuchung der Zellstruktur von E. histolytica wurde beschritten, um Aufschlüsse über die Stoffwechselbedürfnisse zu bekommen.(HARA et al.,1954; LORAN et al., 1955; HALLMAN et al., 1955) Es wurden verschiedene Polysaccharide gefunden. Das Endoplasman der vegetativen Formen von E. histolytica wie auch der Zysten enthält Glykogen. Relativ große Mengen waren von Glucosamin enthalten.

Mit der Hoffnung, daß eine genaue Kenntnis der Enzyme, die in E. histolytica enthalten sind, zu einem besseren Verstehen der Natur dieses Organismus als Parasit führen könnte, und um so eventuell die Faktoren zu ermitteln, die von den Symbionten geliefert werden, haben HILKER & WHITE (1959) in zellfreien E. histolytica-Präparaten die Enzymsysteme des Kohlehydtratstoffwechsels zu ermitteln versucht. Folgende Enzyme wurden gefunden:

(a) Phosphohexoseisomerase
(b) Phosphohexokinase
(c) Aldolase
(d) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
(e) das Entner-Daudoroff Enzymsystem

Dagegen wurden Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), α-Glycerophosphatdehydrogenase und 6-Phosphogluconatdehydrogenase nicht gefunden. Das Vorhandensein der Phosphohexoseisomerase, Phosphohexokinase und Aldolase wurde als Zeichen gewertet, daß die Glykolyse vom Glucose-6-phosphat zum Triosephosphat nach dem bekannten Schema abläuft. Das Fehlen der Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase läßt das Fehlen der Abbaustufe von Triosephosphat zum Pyruvat vermuten, zumindest in diesem zellfreien Präparat. Der Abbau des Hexosemonophosphats scheint ebenfalls nicht zu erfolgen, da die 6-Phophogluconatdehydrogenase fehlt. Hier wird die Feststellung von NAKAMURA & BAKER (1956) angeführt, daß Ribose-5-phosphat ein essentieller Wachstumsfaktor für E. histolytica ist. Das ENTNER-DAUDOROFF-Schema zeigt einen Weg auf, wie die Glucose zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat abgebaut werden kann. (Abb. 1)

Ebenfalls in zellfreien Suspensionen von E. histolytica konnten MIGNANI & BAKER (1961) eine Amylase, Aldolase und Milchsäuredehydrogenase nachweisen. Bei diesen Untersuchungen konnte innerhalb des Protoplasmas der Protozoen eine Aktivität der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. Die alkalische Phosphatase ist einmal lokalisiert in dem Kern, besonders in der Kernmembran, zum andern in dem Endoplasma, insbesondere in den Pseudopodien.

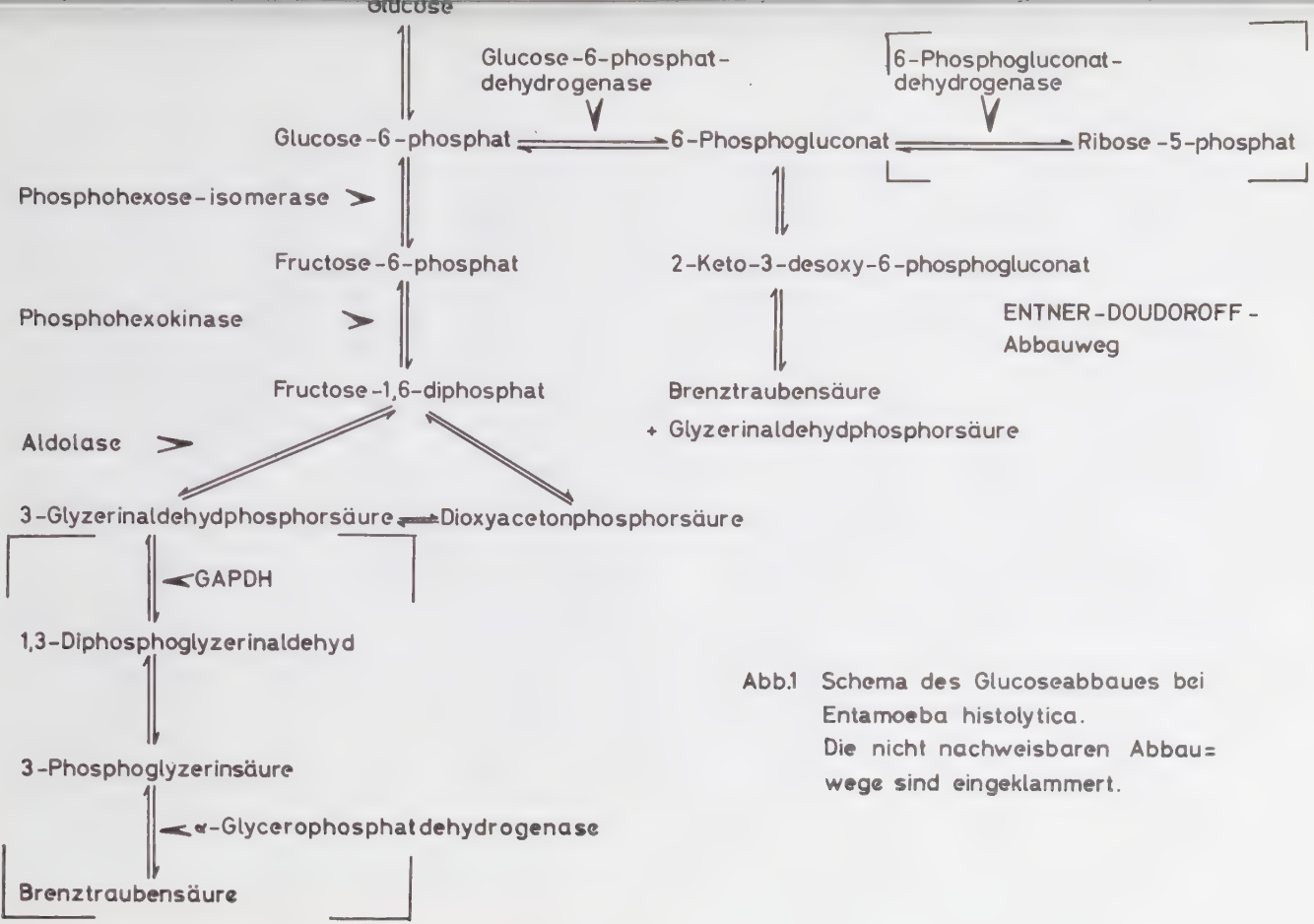


Abb.1 Schema des Glucoseabbaues bei Entamoeba histolytica.
Die nicht nachweisbaren Abbauwege sind eingeklammert.

C. WACHSTUMSFAKTOREN

In den meisten Nährböden sind viele Stoffe enthalten, die von E. histolytica entweder überhaupt nicht, oder zumindest nicht unbedingt benötigt werden. Beim Studium der Lebensanforderungen dieses Parasiten müssen aus der Vielzahl der in den Nährböden enthaltenen Bestandteile die für das Amöbenwachstum unbedingt erforderlichen Substanzen herausgefunden werden. Da diese Stoffe einen unmittelbaren fördernden Einfluß auf das Amöbenwachstum in der Kultur haben, werden sie als Wachstumsfaktoren bezeichnet. Diese Wachstumsfaktoren können nach ihrem Charakter in 2 Gruppen von Stoffen unterteilt werden:
Einmal in die Reihe der Substanzen, die nicht von den Amöben selbst synthetisiert werden können (wie z.B. die Vitamine), zum andern sind unter den Wachstumsfaktoren auch alle die Stoffe zu finden, die als Stickstoff- und Energielieferanten im Stoffwechsel der Amöben benötigt werden.

Neben der Möglichkeit, daß die Wachstumsfaktoren in dem Nährboden enthalten sind, besteht aber noch eine zweite, nämlich daß diese Faktoren von den begleitenden Mikroorganismen geliefert werden. Sei es, daß für die Amöben unbedingt erforderliche Substanzen von den Bakterien synthetisiert und dann an den Nährboden abgegeben werden, oder daß die Amöben die Bakterien phagozytieren und so an die Wachstumsfaktorn gelangen. Die Notwendigkeit der Anwesenheit eines anderen Mikroorganismus in den E. histolytica-Kulturen erschwert das Studium der Ernährungsanforderungen sehr. Es sind daher umfangreiche Untersuchungen über die Rolle der begleitenden Mikroorganismen durchgeführt worden, um die von diesen gelieferten Faktoren zu ermitteln. In diesem Kapitel soll aber nur über diejenigen Stoffe berichtet werden, die bei direkter Zugabe zum Nährboden einen entscheidenden Einfluß auf das Wachstum der Amöbenkulturen haben, sowie über Fraktionen der Bestandteile von Nährböden, die sich bei einer Untersuchung als Wachstumsfaktoren erwiesen haben.

DE LAMATER & HALLMAN (1947) haben eine hitzebeständige

dialysierbare Substanz aus der proteinfreien Fraktion des menschlichen Serums gefunden, die für das Wachstum des NRS-Stammes von E. histolytica in einem Nährboden eines gepufferten Eiweißaufgusses mit Reisstärke, unbedingt erforderlich war. YAKAMOTO (1937) gibt an, daß Ovahormon, Haemoglobin, Erythozyten aus dem Pferdeblut und Vitamine des B-Komplexes,wenn sie dem Nährboden von DOBELL und LAIDLAW hinzugefügt wurden, stimulierend auf das Wachstum der Amöbenkulturen wirkten. HITCHCOCK & RAWSON (1946) fanden in dem dehydrierten koagulierten Eigelb eine wachstumsfördernde Fraktion, die löslich in einer Salzlösung war und Thermostabilität zeigte.

NELSON (1949) gab Ascorbinsäure und Ca-Pantothenat als Wachstumsfaktoren in dem von ihm beschriebenen Eigelbextrakt-Nährboden an. Dabei zeigte sich, daß bei einem Zusatz von Streptomycin zu dem Ascorbinsäure enthaltenden Nährboden das Wachstum von Bakterien und Amöben unterbunden wurde. Wenn der Nährboden aber Ascorbinsäure und Ca-Pantothenat enthielt, hatte das Antibioticum überhaupt keinen Einfluß auf Bakterien und Amöben. In einer späteren Veröffentlichung (1950) schreibt der Autor dem in Eigelb enthaltenen Lecithin eine wachstumsfördernde Wirkung zu, wenn der Eigelbextrakt in einem Agargrund enthalten war. Suspendiert in der überschichtenden Flüssigkeit durfte das Lecithin nur in einer Konzentration von 20 mg% enthalten sein, wenn es noch fördernd wirken sollte.

Die wachstumsfördernde Wirkung des Cholesterin wurde von SNYDER & MELENEY (1943) entdeckt. REES et al. (1944) fanden, daß Cholesterin und 8 Vitamine des B-Koplexes als Wachstumsfaktoren in einem Eiweiß-Nährboden wirkten, wobei aber Cholesterin oder die Vitamine allein keinen fördernden Einfluß zeigten. HANSEN & ANDERSON (1948) verwendeten Cholesterin als essentiellen Bestandteil in ihrem Nährboden. Es bleibt dabei allerdings offen, inwieweit die Wachstumsfaktoren in diesem synthetischen Nährboden nicht Nahrungsstoffe für den Begleitorganismus"t" bilden.

GRIFFIN & Mc. CARTEN (1949) untersuchten die wirksamen Bestandteile des Serums in ihrem LSB-Nährboden. Die ausgefällten Serumproteine, durch ein besonderes Verfahren behandelt und in

einer Phosphatpuffersalzlösung dem Leberaufgußgrund des LSB-Nährbodens wieder hinzugefügt, konnten kein Wachstum unterhalten. Die alkoholunlösliche, acetonlösliche Fraktion war ebenfalls wenig wirksam. Die alkohollösliche Fraktion war dagegen offenbar in der Lage, das Wachstum unumschränkt zu unterhalten. Daraus wurde gefolgert, daß die Wachstumsfaktoren Steroide oder Phospholipide seien. Es zeigte sich, daß Cholesterin in entsprechenden Mengen das Serum in dem LSB-Nährboden ersetzen kann. Ölsäuren in höheren Konzentrationen verstärkten die Wirkung von Cholesterin, wobei vermutet wurde, daß Cholesterin-Oleat nicht als solches benötigt wird, sondern zunächst in seine Grundmoleküle hydrolysiert werden muß.

In fast allen synthetischen Nährböden ist Cholesterin enthalten. Eine Ausnahme macht nur der Nährboden von GREENBERG et al.(1955). In seinem Nährboden aus Trockenpräparaten konnte HANSEN (1950) Cholesterin weglassen, ohne daß eine Wachstumsminderung auftrat. Eine Serie von Kulturen konnte über 16 Übertragungen aufrechterhalten werden. Dies beweist jedoch nicht, daß Cholesterin nicht eine für die Amöben unbedingt erforderliche Substanz ist, da in dem im Nährboden enthaltenen Leberpräparat ja auch Cholesterin enthalten ist.

Neben der Wirkung von Cholesterin als Wachstumsfaktor, zeigte SHARMA (1959), daß Cholesterin auch einen entscheidenden Einfluß auf die Virulenz von E. histolytica hat (wenigstens auf den von ihm getesteten Stamm). In den Versuchen von SHARMA, konnte ein E. histolytica-Stamm in Ratten mit normalem Futter keine Ulcerationen erzeugen. Wenn aber Cholesterin vorher dem E. histolytica-Nährboden zugesetzt wurde oder die Versuchstiere vor der Inokulation mit Cholesterin gefüttert worden waren, entstanden typische Ulcerationen.Neuere Untersuchungen von BIAGI et al.(1962) bestätigten diese Entdeckung.Meerschweinchen bei denen das Cholesterin im Intestinum angereichert wurde, zeigten nach der Inokulation von E. histolytica in vermehrtem Maße die typischen Ulcerationen, ferner verlief das Krankheitsbild schwerer als bei den normalen Versuchstieren. Eine Hypercholesterinaemie bei mit E. histolytica infizierten Meerschweinchen förderte eindeutig die

Bildung von Leberabszessen.

HARTMAN (1949) gibt an, daß in seinem flüssigen Nährboden aus Eigelb, Hefeextrakt und Kochsalz bei einem Reisstärkezusatz Phospholipide in einer optimalen Konzentration von 10- 20 mg % als essentielle Bestandteile enthalten sein müssen.

Im Rahmen systematischer Untersuchungen über den Bedarf von E. histolytica an aliphatischen Substraten, testeten GREENBERG et al. (1955) 33 Subtanzen auf ihre wachstumsfördernde Wirkung in einem einfachen Nährboden aus Ei-Albumin, Reispuder, Glucose, anorganischen Salzen und Mineralien, wobei der Nährboden erst durch den Zusatz geeigneter Testsubstanzen das Amöbenwachstum ermöglichte. Mit Ausnahme der Fumarsäure und Malonsäure handelt es sich bei den auf diese Weise gefundenen Wachstumsfaktoren ausschließlich um aliphatische Amine. Die Zahl der Kohlenstoffatome in diesen Aminen wechselt zwischen 1-5. Es sind primäre, sekundäre und tertiäre Amine darunter und Mono- und Polyhydroxamine, worin Glucosamin und Inosamin eingeschlossen sind: Fumarsäure, Malonsäure, d-Glucosamin, Aminoaethanol, i-Inosamin, Cholin, Dimethylamin, Äthylamin, Di-n-propylamin, 1-Amino-2-propanol, 1-Amino-2-butanol, 2-Amino-1-butanol, 4-Amino-1-butanol, 4-Amino-1-pentanol, Methylamin, Diäthylamin, Triäthylamin.
Als Erklärungen für den Erfolg mit Aminen werden folgende Möglichkeiten angeboten:
(a) Sie stellen Metaboliten dar, die von den Amöben benötigt werden.
(b) Sie dienen als Puffer, sowie als Kohlenstoff- und als Stickstoffquelle.
(c) Sie unterstützen bevorzugt das Wachstum einer begrenzten Menge von Organismen, die das Amöbenwachstum am meisten fördern.

In weiteren Versuchen zur Herstellung eines Nährbodens, der ausschließlich die von den Amöben unbedingt benötigten Bestandteile enthält, stellten GREENBERG et al. (1956) ein Medium her, das anorganische Salze, Reispuder, Glucosaminhydrochlorid und Gelatine enthielt. Glucosamin konnte dabei weder durch Glucose noch durch irgend ein organisches Amin oder einen Aminoalkohol ersetzt werden und war in diesem Nährboden essentiell, wie es vielleicht auch bezeichnend ist, daß die meisten Nährböden, die sich zur Züchtung von E. histolytica eignen, Glucosamin als einen Teil der Glycoproteinen enthalten.

Für die Wirkung von Glucosamin geben die Autoren folgende Möglichkeiten an:

(a) Es könnte als Puffer, sowie als Ernergie- und Stickstoffquelle für die Amöben, die Bakterien oder beide dienen.

(b) Glucosamin selbst oder dessen Abbauprodukte sind für das Amöbenwachstum unbedingt erforderlich.

(c) Es könnte das Wachstum nützlicher Bakterien fördern oder das Wachstum unwirksamer Bakterien hemmen.

(d) Es könnte über den Bakterienstoffwechsel fördernd auf die Amöben wirken.

Den Unsicherheitsfaktor, den die begleitenden Mikroorganismen beim Studium der Wachstumsfaktoren darstellen, konnte NAKAMURA (1955) eliminieren, indem er kurzfristig E. histolytica ohne Bakterien züchtete. Als Grundnährboden diente dabei ein Ringer-Ei-Serum-Medium.

Die ermittelten Wachstumsfaktoren waren:

Ribose-5-phosphat,
Adenosintriposphat (ATP),
durch Erhitzen abgetötete Bakterienzellen,
Diphosphopyridinnukleotid (DPN).

In weiteren ausgedehnten Nachforschungen fanden NAKAMURA & BAKER (1956), ebenfalls unter bakterienfreien Bedinungen, 20 weitere Wachstumsfaktoren. Nach diesen Untersuchungen waren die Intermediate des Nukleinsäurestoffwechsels von Bedeutung für das Amöbenwachstum.

Unbdingt erforderlich waren:

Ribose-5-phosphat,
Adenosintriphosphat,
Purinbasen,
Adenylsäure.

Dagegen waren Ribonukleinsäure und Desoxyribonukleinsäure ohne Einfluß.

Unter den Enzymen und Coenzymen wirkten als Wachstumsfaktoren:

Coenzym A,
Diphosphopyridinnukleotid,
Triphosphopyridinnukleotid,
Leukovorin (Citrovorumfaktor).

Das Succinoxydasesystem zeigte ebenfalls amöbenstimulierende Wirkung, so Cytochrom C, während Katalase keine Wirkung zeigte.

Von den getesteten Vitaminen erwiesen sich Pantethein, Ascorbinsäure, Folsäure und Vit. B_{12} als essentielle Wachstumsfaktoren. Anderseits stimulierten Ca-Pantothenat, Paraaminobenzoesäure, Riboflavin, Pyridoxinhydrochlorid und Thiaminhydrochlorid die Vermehrung von E. histolytica nicht.

Fruktose-1-6-diphosphat, Oxalessigsäure, Malonsäure und Aspargin zeigten ebenfalls stimulierende Wirkungen. Auch die Rolle dieser Wachstumsfaktoren im Stoffwechsel von E. histolytica wurde von den Autoren diskutiert. Ribose-5-phosphat spielt eine bedeutsame Rolle im Kohlehydrat und Nukleinsäurestoffwechsel.

Die Purinbasen und Pyrimidinbasen werden als Bausteine der Nukleoproteine benötigt. Die wachstumsförderne Wirkung der Oxalessigsäure und von Aspargin wird mit der Nukleinsäuresynthese in Zusammenhang gebracht, ebenso die Wirkung von Folsäure und Vit. B_{12}. Coenzym A und Pantethein kann von den Amöben offensichtlich nicht synthetisiert werden.

Da sich Pyrimidin und Purin als Wachstumsfaktoren erwiesen, hat NAKAMURA (1957) untersucht, ob die Vorstufe des Purinringes, das 5-Aminoimidazol-carbonsäureamid-(5), ebenfalls eine wachstumsfördernde Wirkung habe. Dabei zeigte das 4-Amino-5-imidazolcarboxamid und das 4-Amino-5-imidazolcarboximidin, besonders in Kombination mit Folsäure und Leucovorin, höchst stimulierende Wirkung.

Während bei den Untersuchungen von NAKAMURA & BAKER (1956) für die Vermehrung von E. histolytica wohl Coenzym A, dagegen aber nicht der Baustein des Coenzym A, die Pantothensäure in Form des Ca-Pantothenats, von Nutzen war, konnten REEVES et al. (1959) zeigen, daß sowohl Ca-Pantothenat als auch Pantethein und Coenzym A jedes für sich wachstumsfördernde Wirkung hatte. Bei der Übertragung der Amöben aus einem modifizierten S.-F.-Nährboden (REEVES et al., 1957) in einem Nährboden, in dem das Caseinverdauungsprodukt durch ein vitaminfreies Säurehydrolysat von Casein substituiert worden war, wuchsen die Amöben ausschließlich bei einem Zusatz von 10 - 20 mg Ca-Pantothenat. In dem vitaminhaltigen M.-S.-F.-Nährboden, konnte das Amöbenwachstum unterbunden werden durch

Zusatz des Vit.-B_6-Anagonisten Desoxypyridoxal, wobei durch einen Zusatz von Pyridoxol oder Pyridoxolphosphat, sowie von Pyridoxamin diese Wirkung wieder aufgehoben werden konnte (REEVES et al., 1959). Auch in dem Cleveland-Collier-Nährboden in Gegenwart einer sich vermehrenden gemischten Bakterienflora war Desoxypyridoxol wirksam, wodurch die Frage nicht beantwortet werden konnte, ob die Wirkung des Antimetaboliten auf die Amöben gerichtet ist oder auf die begleitenden durch Penicillin gehemmten Bakterienzellen.

Wie NAKAMURA & BAKER (1956) gezeigt haben, konnte auch durch den Co-A-Antagonisten, bis-N-phenyl-ß-amin-äthyldisulfid (PAED), in einem mit einer Serum-Ringer-Lösung bedeckten Eischrägnährboden bei einem Zusatz von Na-Thioglykolat, Dextrose und Reisstärke, das Amöbenwachstum unterbunden werden, jedoch nur bei gleichzeitiger Hemmung der Bakterienflora durch Penicillin und Streptomycin. Durch den Zusatz von Pantethein, einem Baustein des Co-A, sowie durch Co-A selbst und auch durch den Zusatz lebender Bakterien konnte die Wirkung des PAED aufgehoben werden.

Auch die Bedeutung der Purinbasen und Pyrimidinbasen als Wachstumsfaktoren konnte durch NAKAMURA & JOHNSON (1957) durch den Zusatz von Purin- und Pyrimidinanalogen, die als Antimetaboliten wirkten, bestätigt werden. Substituierte Pyrimidinbestandteile mit einer Dechloracetamido-Kette waren am stärksten wirksam. Eine geringere amöbicide Wirkung zeigte 2-Aminopyrimidin. Unter den getesteten Purinanalogen waren Puromycin und das Aminonukleotid von Puromycin höchst wirksam. Bei diesen Purinanalogen konnte die Hemmung aufgehoben werden durch Adenylsäure und in einem geringeren Maße mit Adenin, dagegen nicht mit Guanin. Hieraus schlossen die Autoren, daß E. histolytica einen ausgesprochenen Bedarf an Adenylsäure und Adenin habe. Uracil-5-carboxyl erwies sich als Antimetabolit des Uracil. 5-Hydroxyuracil und 2-Thio-4-oxy-5-pyrimidin zeigten ebenfalls hemmende Wirkung.

Diese Erkenntnisse über die Antimetaboliten sind nicht nur als Bestätigung der Wirkung und zur Differenzierung der Wachstumsfaktoren von Wert, sondern gewinnen vor allen Dingen durch ihre Wirkung als Amöbicide in der Therapie Bedeutung.

Tab. VII

Autoren	Grundnährboden	Wachstumsfaktoren
De LAMATER,J.N. & HALLMAN,F.A. 1947	Gepufferter Eiweißaufguß mit Reisstärke	Hitzebeständige dialysierbare Substanz aus der proteinfreien Fraktion des menschlichen Serums.
YAKAMOTO,J. 1937	DOBELL-LAIDLAW-NÄHRBODEN	Ovahormon Haemoglobin Erythrozyten vom Pferd Vitamine des B-Komplexes
REEVES,R.E.,MELENEY,H.E., FRYE,W.W. & ISBELL,D. 1959	modif.S.-F.-Nährboden mit durch Penicillin gehemmten Bakterien	Pyridoxin (VItamin B_6)
NELSON,E.C. 1949	Eigelbextrakt -Nährboden	Ascorbinsäure Ca-Pantothenat
REEVES,R.E.,MELENEY,H.E. & ISBELL,D. 1959	mod.S.-F.-Nährboden	Ca-Pantothenat Coenzym A
NELSON,E.C. 1950	Eigelbextrakt in Agargrund überschichtet mit Puffersalzlösung	Lecithin,das aus dem Eigelb im Agargrund in die überschichtende Flüssigkeit diffundierte
SNYDER,T.L. & MELENEY,H.E. 1943		Cholesterin
REES,C.W.,BOZICEVICH,J., REARDON,L.V. & DAFT,F.S. 1944	Eiweiß-Nährboden	Cholesterin + Vitamine des B-Komplexes
HANSEN,E.L. & ANDERSON,H.H. 1948	synthetischer Nährboden	Cholesterin
GRIFFIN,A.M. & Mc. CARTEN, W.G. 1949	LSB-Nährboden	Cholesterin als Serumsubstituent
SHARMA,R. 1959	BOECK-DRBOHLAV-Nährboden	Cholesterin als essentieller Faktor ausschlaggebender Beeinflussung der Virulenz
HARTMAN,E. 1949	Nährlösung aus Eigelb,Hefeextrakt u.NaCl mit Reisstärke	Phospholipide in einer Konzentration von 10-20 mg %

Tab.VIII

Autoren	Grundnährboden	Wachstumsfaktoren
GREENBERG,J.,TAYLOR,D.J. & BOND,H.W. 1956	Grundnährboden aus anorganischen Salzen,Reispuder und Gelatine	Glucosamin
NAKAYAMA,A. 1958	feste Komponente aus Agar + Ringerlösung flüssige Komp.:1' Na-Citrat in Ringerlösung + Reisstarke	Albumin Glucosamin (in Albumin enthalten) Gelatine Glycoproteide Phosphoproteide Proteose-Pepton Gluthathion

Autoren	Grundnährboden	W A C H S T U M S F A K T O R E N
GREENBERG,J.,TAYLOR,D.J. & BOND,H,W. 1955	Grundnährboden aus anorg. Salzen + Eialbumin + Reisstärke	Fumarsäure (Malonsäure) d+Glucosamin Aminoäthanol i-Inosamin Cholin 1-Amino-2-propanol 1-Amino-2-butanol 2-Amino-1-butanol 4-Amino-1-butanol 4-Amino-1-pentanol Methylamin Dimethylamin Äthylamin Diäthylamin Triäthylamin Di-n-propylamin
NAKAMURA,M. 1956	bakterienfreie Züchtung des NRS-Stammes auf einem modif.Boeck-Drbohlav-Nährb. (Penicillin+Streptomycin 0,5%Glucose,Natriumthio-glycolat,Reispuder)	Ribose-5-phosphat Adenosintriphosphat (ATP) Adenin, Guanin, Xanthin } Purinderivate Cytosin, Uracil, Thymin } Pyrimidinderivate Adenylsäure Coenzym A Diphosphopyridinnukleotid (DPN) Triphosphopyridinnukleotid (TPN) Cytochrom C Succinase System Leucovorin Panthethein Ascorbinsäure Folsäure Vitamin B_{12} Vitamine Oxalessigsäure Fructose-1,6,-diphosphat Malonsäure Asparagin
NAKAMURA,M. 1957		4-Amino-5-imidazolcarboxamid 4-Amino-5-imidazolcarboximidin als Vorstufen des Purinringes

II. PHYSIKO-CHEMISCHE FAKTOREN

A. DER EINFLUSS DER TEMPERATUR

Besonders bei den Stuhluntersuchungen zur Diagnose der Amöbenruhr ist die Kenntnis des Verhaltens der Amöben bei den verschiedensten Temperaturen von Bedeutung.

Untersuchungen der Überlebenszeiten der vegetativen Formen von E. histolytica bei Abkühlung oder Erwärmung über 37°C. sind bisher wenige veröffentlicht worden. TSCHUCHIYA (1945) fand in Stuhlproben bei niederen Temperaturen eine Überlebenszeit von 48 - 96 Stunden, bei Zimmertemperatur 6 - 16 Stunden und 2 - 5 Stunden bei 37°C. DREYER (1961) gelang es einen E. histolytica-Stamm 2 1/2 Jahre lang bei Zimmertemperatur in der Kultur zu halten.

Über detaillierte Temperaturstudien mit 6 E. histolytica-Stämmen verschiedenen Ursprungs (UC, 201, 202 F 22 SB, K9, K14) und mit unterschiedlichen Bakterienfloren, sowie einem E. coli Stamm, berichten CABRÈRA & PORTER (1958). In einem Ei-Ringer-Nährboden bedeckt mit Lockescher Lösung wurde die Überlebenszeit bei unterschiedlicher Temperatur (von 3°C. bis 45°C.) untersucht. Zur Untersuchung der Kulturen bei erniedrigten Temperaturen wurde im Abstand von 24 Stunden immer eines der bei der gewünschten niederen Temperatur gehaltenen Kulturröhrchen für 48 Stunden bei 37°C. bebrütet; die Kulturröhrchen die bei erhöhter Temperatur gehalten wurden, wurden direkt untersucht und bei negativem Ausfall noch Subkulturen angefertigt.

Die durchschnittliche Überlebenszeit der verschiedenen E. histolytica Stämme war bei:

3°C.	2-4 Tage	37°C.	3-9,7 Tage
18°C.	2-4,3 Tage	41°C.	4-8,7 Tage
25°C.	2-5 Tage	45°C.	1-3,5 Stunden
32°C.	3-11,3Tage		

Am Rande sei dabei vermerkt, daß der mitgetestete E. coli-Stamm gegenüber niederen Temperaturen empfindlicher war, dagegen resistenter gegenüber höheren Temperaturen.

Ein Wechsel der Bakterienflora hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Überlebenszeit von E. histolytica. Dagegen unterschieden sich die einzelnen Stämme von E. histolytica stark in der Überlebenszeit bei den verschiedenen Temperaturen. Z.B. lebte ein Stamm bei 3°C. nur einen Tag, während ein anderer Stamm bei derselben Temperatur 4 - 5 Tage überlebte.

In einer anderen Versuchsreihe wurden die kritischen Temperaturen für 3 Stämme von E. histolytica (UC, 201, 202) und für einen E. coli Stamm bestimmt. Bei 33°C. wuchsen alle Stämme so gut wie bei 37°C. Bei 32°C. wuchs der E. coli-Stamm nicht mehr. Die E. histolytica-Stämme wuchsen bei dieser Temperatur zunächst spärlich und viele Amöben zeigten große Vakuolen. Nach mehreren Übertragungen hatten sich alle E. histolytica-Stämme gut adaptiert. Die Senkung der Temperatur von nur 0,5°C. unter 32°C. bewirkte bei den meisten der Stämme einen Stillstand des Wachstums. Die obere kritische Temperatur lag für E. histolytica wie auch für E. coli bei 40°C. bis 41°C.. Bei diesen Temperaturen konnten Kulturen über einen Monat aufrecht erhalten werden. Bemerkenswert ist wiederum, daß die kritische Temperatur der einzelnen Stämme durch einen Wechsel der Bakterienflora nicht beeinflußt wurden. Es wurde daraus gefolgert, daß die Temperaturadaption eine Eigenschaft der Amöben ist.

Anknüpfend an diese Untersuchungen warf CABRERA (1958) die Frage auf, ob diese adaptierten Stämme dieselben Verhaltensweisen zeigten wie die nicht adaptierten. Detaillierte Vergleiche der adaptierten Stämme mit den nicht adaptierten brachten nun folgende Ergebnisse:

1. Der Stamm 201, adaptiert auf 30°C., encystierte, wenn er auf die Normal-Temperatur von 37°C. gebracht wurde; desgleichen encystierte der Stamm UC, wenn er nach der Adaption auf 42°C. auf die Normal-Temperatur von 37°C. gebracht wurde.
2. Die unadaptierten Stämme 201 und 202 zeigten einen niederen Grad der Virulenz bei Injektion in die Hamsterleber, während sie adaptiert an niedere Temperaturen höchst virulent waren.
3. Die Virulenz dieser adaptierten Amöben verlor sich auch nicht durch eine 6-wöchige Inkubation bei 37°C..
4. Das Hinzufügen von Bakterien einer adaptierten Kultur zu nicht adaptierten Amöben mit geringer Virulenz bewirkte eine mäßige Steigerung der Virulenz.

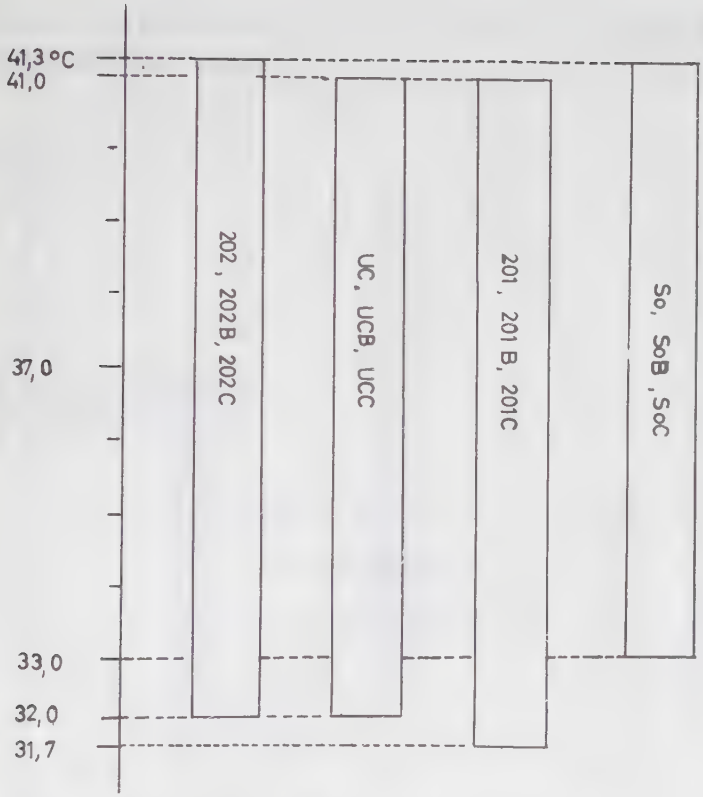


Abb.2 Temperaturbereiche für das Wachstum verschiedener Amöbenstämme. (nach CABRERA & PÜRTER)

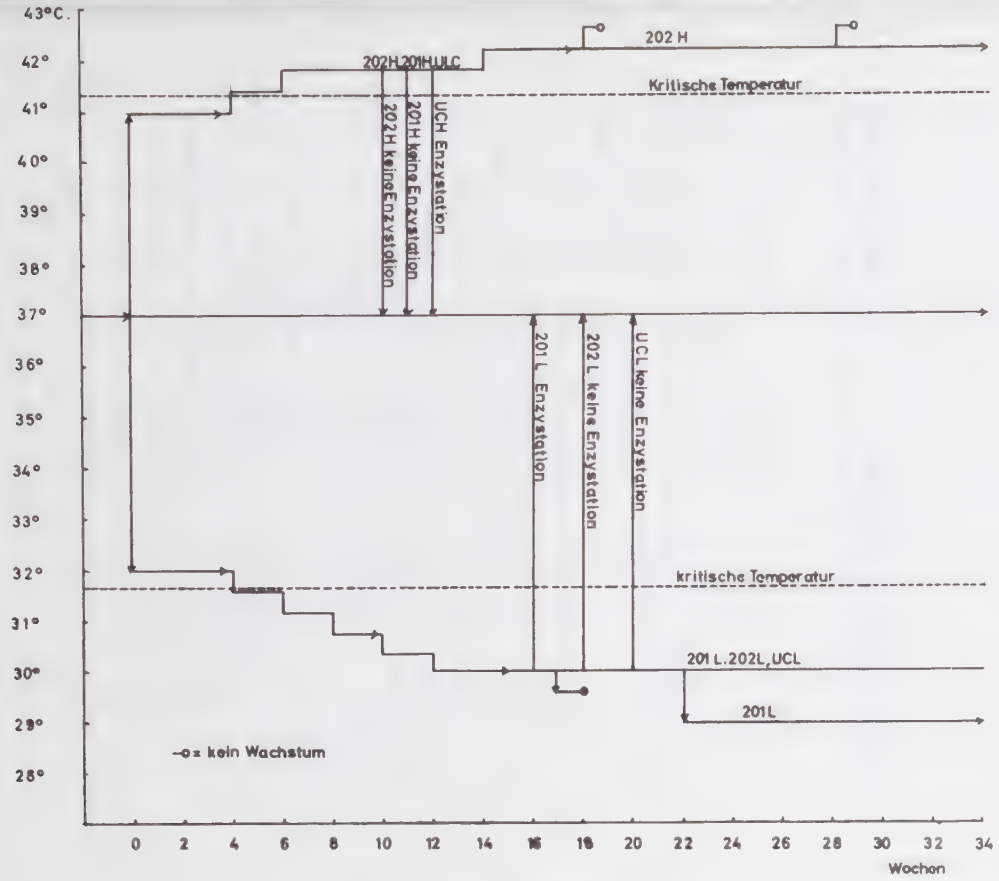
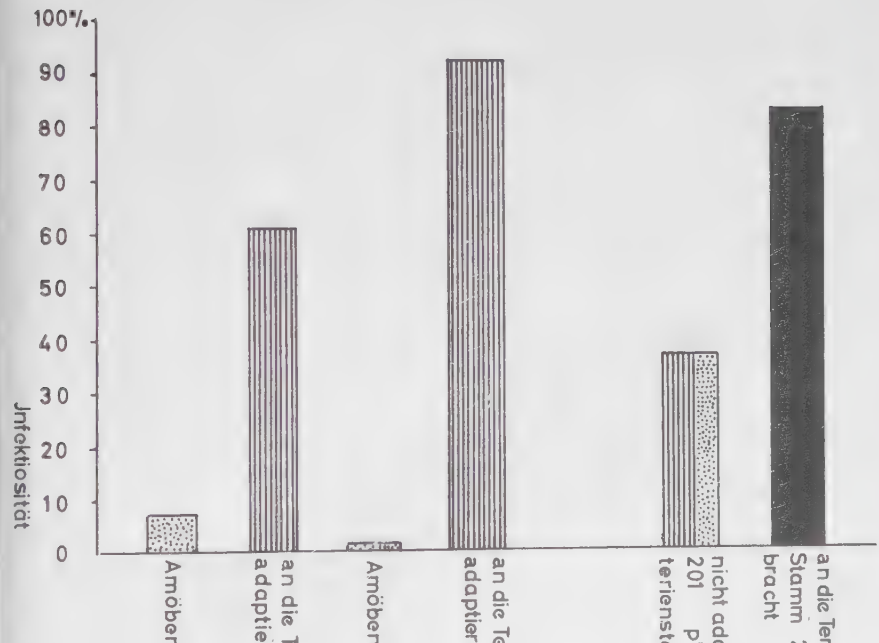


Abb. 3 Die Adaption von E. histolytica an erniedrigte und erhöhte Temperaturen (nach CABRERA, H.A. 1958)

b.4 Versuche über die Wirkung der Temperaturadaption auf die Virulenz (nach CABRERA, H.A. 1958)



B. DIE WASSERSTOFFIONEN - KONZENTRATION

Schon BOECK & DRBOHLAV (1925) konnten mit dem ersten für die Kulturhaltung von E. histolytica geeigneten Nährboden die Bedeutung des p_H-Wertes für das Wachstum dieser Organismen aufzeigen. Die größten Amöbenpopulationen wurden erreicht, bei einem Ausgangs-p_H-Wert von 7,2 bis 7,8. Durch die fermentative Tätigkeit der Bakterien (Kohlehydratabbau) und die dabei entstehenden sauren Stoffwechselprodukte war der p_H-Wert bereits nach einer 24-stündigen Inkubation auf Werte um 6,0 oder darunter gesunken. Diese Experimente sind ein Jahr später von CRAIG (1926) bestätigt worden. Kulturen mit einem anfänglichen p_H-Wert von 6,0 enthielten nach einer 48-stündigen Inkubation bereits keine lebenden Amöben mehr.

Wie aus der Beschreibung der Kulturmethoden hervorgeht, haben zahlreiche Autoren den Nährböden Pufferlösungen hinzugefügt, um den p_H-Wert über längere Zeit in für das Amöbenwachstum günstigen Grenzen zu halten. Alle diese Puffer sind Phosphatpuffer; sie bringen den Vorteil, daß Subkulturen nur alle 3 - 6 Tage angefertigt werden müssen.

In seinen Studien über die Abhängigkeit des Wachstums und der Encystation von E. histolytica in Nährböden von dem p_H-Wert, fand CHANG (1942) die größten Amöbenpopulationen bei p_H-Werten zwischen 6,8 und 7,8. Die optimale Salzkonzentration der Pufferlösung wird mit einer 30-molaren Phosphat- und 0,4%igen NaCl-Konzentration angegeben bzw. 40-molaren-Phosphat- und 0,8%igen NaCl-Konzentration. (Die totale Salzkonzentration dieser Lösung liegt mit einer Pufferung auf p_H 7,6 bei 0,87%.)

Statt des üblichen Phosphatpuffers berichten BLUMENTHAL et al. (1954) über die Verwendung von Aminosäurepuffern. Es wurden 3 Puffersysteme als Substituenten des Phosphatpuffers in der STONE'schen Lösung erprobt: dl-Alanin, l-Glutaminsäure und dl-Asparaginsäure, jeweils in 0,1-molarer Konzentration mit ca. 2-normaler NaOH Lösung. Die Auswahl erfolgte mehr auf

Grund der physiologischen Eigenschaften dieser Aminosäuren als auf Grund der Pufferkapazität. Da im Stoffwechsel das Phosphat in der Energiespeicherung und Energieübertragung eine wichtige Rolle spielt, wurde die Frage aufgeworfen, inwieweit der Phosphatpuffer nicht als Quelle anorganischen Phosphats diene, zumal in den Amöben eine aktive saure Phosphatase nachgewiesen wurde (BALAMUTH, 1950). Als Phosphatquelle bei Verwendung eines Aminosäurepuffersystems, wird von den Autoren der Eischrägnährboden, die Bakterienflora und der Reispuder angegeben.

C. DAS REDOXPOTENTIAL

Anaerobier benötigen für ihren Stoffwechsel Nährmedien, die reduzierende Substanzen in einer bestimmten Konzentration enthalten. Die reduktive Kraft - wie auch die oxydative - findet ihren zahlenmäßigen Ausdruck in dem Redoxpotential.

Die Bedeutung des Redoxpotentials in der Züchtung von E. histolytica auf Nährböden ist erst diskutiert worden im Zusammenhang mit Versuchen zur Substitution der begleitenden Bakterienflora. So waren DOBELL & LAIDLAW (1926) der Ansicht, daß E. histolytica unter aeroben Bedingungen wachsen kann. Erst JAKOBS (1941) stellte bei Messungen des Redoxpotentials in E. histolytica-Nährböden fest, daß bei ausgesprochen hohen negativen Eh-Werten (zwischen -300 bis -500 mV) die Amöbenpopulationen wesentlich grösser waren. Negative Werte von mindestens -114 bis -150 mV mussten gegeben sein, um eine Vermehrung zu gewährleisten. Eine eventuelle Bedeutung anaerober Bedingungen für das Wachstum von E. histolytica lag nahe durch die Notwendigkeit anaerober Bedingungen für die Excystation und durch die Tatsache, daß im menschlichen Darm, wie auch in den Nährböden bei einer anaeroben bakteriellen Begleitflora, anaerobe Verhältnisse vorliegen (RAHN & RICHARDSOHN, 1941).

Zur Untersuchung dieser Frage züchteten SNYDER & MELENEY (1943) E. histolytica unter anaeroben Bedingungen (Sauerstoffabsorption durch Pyrogallol). Die anaerobe Züchtung gelang in 4 verschiedenen Medien. Einmal wurden E. histolytica und Bakterien in einen bakterienhaltigen Eiweißaufguß überimpft. Ein zweites Medium enthielt eine Fraktion lebender gewaschener Bakterien und eine Fraktion eines sterilen Filtrats einer Bakterienkultur. Während die lebenden Bakterien nicht durch die durch Erhitzen abgetöteten Bakterien ersetzt werden konnten, konnten sie in einem weiteren Medium durch sterile reduzierende Bestandteile ersetzt werden (Cystein und Thioglykolat). Seitdem gelten die anaeroben Bedingungen allgemein als für das Wachstum von E. histolytica unbedingt erforderlich.

Man mißt das Redoxpotential, indem man in die Lösung des Reduktionsmittels (Nährlösung) eine blanke Platin- oder Glaselektrode eintaucht und ihr Potential gegen eine normale Wasserstoffelektrode mißt. Als Vergleichswert dient das Potential E_o, das ein Gemisch äquimolekularer Mengen der reduzierten und oxydierten Substanz bei einer Temperatur von 25°C. aufweist. E_o ist abhängig von dem p_H-Wert. Im konkreten Fall wird das Potential E_h gemessen. E_o und E_h stehen in folgender Beziehung:

$$E_h = E_o - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{\text{oxyd. Anteil}}{\text{red. Anteil}}$$

R = Gaskonstante
T = absolute Temperatur
F = Faraday
n = Anzahl der Elektronen, die die Substanz liefert, wenn sie von der reduzierten in die oxydierte Form übergeht.

Das Redoxpotential ist negativ, wenn die Substanz gegenüber der Wasserstoffelektrode reduziert wird.

Die Bedeutung des Redoxpotentiales liegt darin, daß alle Substanzen enzymatische Reaktionen entweder durch vollständige Oxydation oder Reduktion blockieren können, wenn sie sich mit ihrem E_o-Wert genügend unterscheiden von dem in die enzymatischen Reaktionen eingeschlossenen System.

Im Bereiche der Biologie hat das Redoxpotential die größte Beachtung in der Bakteriologie gefunden. Von den Bakterien ist bekannt, daß sie sich in aerobe und anaerobe Keime einteilen lassen und fähig sind, das Redoxpotential eines Nährbodens auf negative Werte zu senken. Im allgemeinen können Aerobier ein aerobes Medium (E_h um 300 mV) auf etwa -200 mV senken, während die Anaerobier bei derartig hohen positiven Werten nicht wachsen können und das Redoxpotential von niederen positiven Werten auf -400 mV senken können. In dem Kapitel über die bakterielle Begleitflora wird die Bedeutung dieser Fähigkeit in Bezug auf die Rolle der Bakterien als Amöbionten noch gesondert behandelt.

Nachdem verschiedene Autoren die anaeroben Bedingungen als obligatorisch für das Amöbenwachstum angesehen hatten, lag es nahe, die Wirkung der begleitenden Bakterienflora auf die Bildung eines stark negativen Redoxpotentials zurückzuführen.

Bei der Untersuchung dieser Zusammenhänge fand CHANG (1946) wiederum enge Beziehungen zwischen dem Redoxpotential des Mediums und dem Amöbenwachstum. Am größten waren die Amöbenpopulationen bei E_h-Werten zwischen -390 mV und -425 mV,

geringer zwischen -275 mV bis -350 mV, noch geringer bei -200 mV bis -275 mV, und bei einem Redoxpotential zwischen -50 bis -150 mV wurde keine Vermehrung mehr beobachtet, während die Amöben bei E_h-Werten zwischen -50 mV bis +50 mV zugrunde gingen oder sich encystierten.

Weitaus geringere negative Werte für das Wachstumsoptimum geben MORETTI & CATROS (1950) an. So war bei Ihnen die Amöbenpopulation am größten bei einem Redoxpotential zwischen -100 mV und -160 mV. Sie fanden außerdem, daß bei virulenten Stämmen das Wachstumsoptimum bei stärker negativen Werten lag. In einer späteren Veröffentlichung gibt JACOBS (1950) an, daß sich E. histolytica innerhalb weiter Grenzen des Redoxpotentials vermehren kann. Die enge Beziehung hoher negativer Werte des Redoxpotentials mit dem Amöbenwachstum konnte nicht bestätigt werden. Es wurde gefunden, daß das Amöbenwachstum in dem LER-Nährboden auch noch bei geringeren negativen Werten als -150 mV ausgezeichnet war, woraus die Autoren schlossen, daß in den Versuchen von CHANG (1946) und in den früheren Versuchen von JACOBS (1941) andere Faktoren als die E_h-Werte den Rückgang der Amöbenpopulation bewirkten.

Zum Vergleich sei noch das Redoxpotential des Darminhaltes angeführt. SAWADA et al. (1953) fanden bei Messungen des Darminhaltes verschiedener tierischer Wirte die niedrigsten Werte zwischen -150 mV und -450 mV im Caecum.

Aus der Beobachtung, daß die CO_2-Konzentration in dem Gewebe des Wirtes höher ist als in der Luft, hat HARTMAN (1951) die CO_2-Spannung über dem Medium erhöht. Es zeigte sich dabei, daß E. histolytica bei einem CO_2-Gehalt von 30% bis zu 50% ein deutlich besseres Wachstum zeigte, als bei dem natürlichen CO_2-Gehalt der Luft in dem Kulturröhrchen von 2%.

Das Redoxpotential des E. histolytica-Nährbodens resultiert aus der reduzierenden Tätigkeit der Bakterien, der reduzierenden Wirkung des Substrats und der Diffusion von Sauerstoff in den Nährboden (JACOBS, 1950). Wenn daher ein negatives Redoxpotential aufrechterhalten werden soll, müssen diese 3 Faktoren berücksichtigt werden. Damit das Substrat die reduzierende

Wirkung erhält, wurden von verschiedenen Autoren Reduktionsmittel hinzugefügt. So führten SNYDER & MELENEY (1943), wie bereits erwähnt wurde die Verwendung des Thioglykolats in den E. histolytica- Nährböden ein. Seither haben viele Autoren den Thioglykolatzusatz benützt, um günstige anaerobe Bedingungen zu schaffen (SHAFFER et al., 1948;GRIFFIN & Mc CARTEN 1950;GRIFFIN & MICHINI,1950;NAKAMURA 1952).HANSEN (1950) benützte Cystein, das zusammen mit anderen reduzierenden Substanzen mit Sulfhydril-Gruppe natürlicherweise im Muskelfleisch (Extrakte), in der Leber, sowie anderen Organen vorkommt und somit auch in den Nährbouillons, in dem Leberaufguß und auch in den aus Fleisch hergestellten Peptonen enthalten ist.

Neben dem Zusatz von reduzierenden Substanzen in den E. histolytica-Nährmedien wird zum Fernhalten des Luftsauerstoffs vielfach mit Paraffin, Paraffinöl oder Vaseline überschichtet (SHAFFER,RYDEN und FRYE,1948; u. a.).

III. DIE BEDEUTUNG DER AMÖBIONTEN IN NÄHRBÖDEN FÜR ENTAMOEBA HISTOLYTICA

A. DIE BAKTERIENFLORA

Die genaue Kenntnis der Wirkungsweise der Bakterienflora in E. histolytica-Kulturen ist eine der wichtigsten Forderungen, seitdem bekannt ist, daß die begleitenden Bakterien in der Ätiologie und Pathogenese der Amöbenruhr eine wesentliche Rolle spielen (PHILLIPS et al. 1958; PHILLIPS et al., 1955).

Von verschiedenen Autoren ist versucht worden, bakterienfreie Reinkulturen von E. histolytica über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Eine Übersicht über die bisherigen Versuche mit Reinkulturen wird in einem gesonderten Kapitel gegeben. Für die Züchtung von E. histolytica über einen größeren Zeitraum ist eine begleitende Bakterienflora unbedingt erforderlich. Den meisten Autoren zufolge bewirkt ein Rückgang der Bakterienbesiedelung eine Schädigung der Amöbenpopulation. Scheinbar dazu im Gegensatz steht die Beobachtung von SPINGARN & EDELMAN (1947), daß das Überleben der Amöben durch einen Zusatz von 1000 - 3000 Einheiten Streptomycin von durchschnittlich 8 auf 33 Tage verlängert wurde. Jedoch entsteht bei einer Überwucherung der Amöben durch die Bakterien ein saures Milieu das sich ungünstig auf das Amöbenwachstum auswirkt. Eine Hemmung der überhandnehmenden Bakterienflora muß sich demnach günstig auf das Amöbenwachstum auswirken.

Nachdem es CLEVELAND & SANDERS (1930) gelungen war, durch Injektion von E. histolytica mit einer in ihrer Virulenz abgeschwächten bakteriellen Mischflora in die Kaninchenleber bakterienfreie Amönenabszesse zu erzeugen, drängte sich der Gedanke auf, die Leber müßte in der Lage sein, die von den Bakterien gelieferten Faktoren zu substituieren (REES et al., 1941). Jedoch muß dem entgegengehalten werden, daß bald nachdem die Amöbenabszesse bakterienfrei geworden waren, sie auch zu heilen begannen und die Amöben binnen weniger Tage zugrunde gingen.

Es erhebt sich nun die grundlegende Frage nach dem Wirkungsprinzip der wachstumsfördernden Amöbionten in der E. histolytica-Kultur. Die bisher veröffentlichten Untersuchungen zeigen vier Möglichkeiten auf, die die Wechselwirkung der Bakterien und Amöben erklären könnten.

1. Ein S t o f f w e c h s e l p r o d u k t , das von den sich vermehrenden Bakterien in die Nährlösung freigesetzt wird, könnte als Wachstumsfaktor dienen. Diese Möglichkeit wurde von BALAMUTH & HOWARD (1946), CHANG (1946) und NAKAMURA (1952) diskutiert. REES et al. (1941) nahmen an, daß die hydrolytischen Spaltprodukte, die entstehen, wenn Bakterien im Reagenzglas Nahrungsstoffe angreifen (was auch für den Intestinaltrakt oder sonst ein Organ zutrifft, in welchem Bakterien und Protozoen als Parasiten leben), von den Amöben zum Wachstum benötigt werden.

2. Die Bakterienflora könnte ein E n z y m s y s t e m darstellen, welches von den Amöben gebraucht wird, um Nahrungsstoffe aus dem Nährboden verwerten zu können (CHANG, 1946; NAKAMURA, 1952).

NAKAMURA (1952) hat die begleitenden Trypanosomen durch ein Enzympräparat ersetzt. Die Wahl des Enzymes traf er nach dessen Verhalten gegenüber einer Erwärmung über 48° C., unter Auswertung der Versuche von PHILLIPS & REES (1950), die festgestellt hatten, daß durch ein 10 Min. langes Erhitzen auf 48° C. inaktivierte T. cruzi das Wachstum aufrechterhalten, dagegen nicht, wenn sie dieselbe Zeit auf 50° C. erhitzt werden. Es handelte sich also möglicherweise um ein Enzym der Trypanosomen, das bei einer Temperatur über 48° C. inaktiviert wird. Da die Succino-Dehydrase durch Temperaturen über 48° C. inaktiviert wird, sich also in der Temperaturempfindlichkeit gleich verhält wie die ganzen Trypanosomenzellen, wurde sie zu Substitutionsversuchen benützt. In einem bakterienfreien Nährboden mit Succino-Dehydrogenase (Präparat aus dem Rattenherz) konnte E. histolytica bei einer Überimpfung alle 48 Stunden über 10 Subkulturen gezüchtet werden, während im Kontrollversuch ohne Succinodehydrogenase nur 2 Subkulturen möglich waren.

Auch die Abhängigkeit des F22-Stammes von einem begleitenden Streptobacillus haben LORAN et al. (1956) auf den Glucosestoff-

wechsel bezogen.E. histolytica enthält relativ große Mengen von Glucosamin,wobei die Amöben Glucosamin nicht synthetisieren können. Da die Entamöben diesen Aminozucker aber unbedingt brauchen, bedürfen sie der bakteriellen Begleitflora. Es wurde festgestellt, daß die Amöben selbst die Glucose als solche nicht benutzen, sondern nur die Produkte des Glucosestoffwechsels der monobakteriellen Begleitflora.

3. In einigen Fällen mögen die B a k t e r i e n a l s N a h r u n g dienen (REES et al., 1941). Auch dies ist eine Möglichkeit, weil Amöbenkulturen mit durch Erhitzen abgetöteten Bakterienzellen aufrechterhalten werden konnten (JACOBS, 1947; HARINASUTA, 1955).KARLSSON et al. (1952) haben in abgetöteten Bakterienzellen (Streptobacillus sp.) Wachstumsfaktoren gefunden. Während die durch Erhitzen abgetöteten Bakterienzellen das Wachstum von E. histolytica-Kulturen förderten, führte eine Extraktion des Wachstumsfaktors durch Trocknung der Bakterien und Herstellung eines Aufgusses mit den verschiedensten Extraktionsmitteln, der nach dem Eindicken dem Nährboden beigegeben wurde, zu einem negativen Ergebnis. Die Substanz war also nur in der intakten Bakterienzelle wachstumsfördernd. Dagegen erzielten SAWADA et al. (1953) eine Förderung des Amöbenwachstums, indem sie der flüssigen Komponente von E. histolytica-Kulturen bakterielle Zellbestandteile hinzufügten. Die Bakterien (Staphylococcus aureus, Bacillus mycoides) wurden in der flüssigen Komponente des Amöbennährbodens gefroren und nach dem Auftauen gefiltert, um alle übriggebliebenen sichtbaren Organismen zu entfernen. Die bakteriellen Bestandteile dienten als Serumersatz in einer Modifikation des Nährbodens nach TANABE und CHIBA.

BENHAM & HAVENS (1958) benützten das Filtrat einer durch Gefrieren und wieder Auftauen vorbehandelten Trypanosomen-Aufschwemmung zur Substitution der Amöbionten. Das Wachstum konnte über 10 Kulturen aufrechterhalten werden. Die Amöbenpopulationen waren jedoch gering. NAKAMURA (1956) fand in seinen Studien über die Wachstumsfaktoren, daß durch Erhitzen abgetötete Bakterienzellen, ein Hefedialysat, UV-behandelte Bakterienzellen und durch Gefrieren und wieder Auftauen behandelte Bakterienzellen das Wachstum einer E. histolytica-Kultur in Abwesenheit sich vermehrender Bakterien, förderten.

Der Nährboden war eine Modifikation des BOECK-DROHLAV-Mediums mit Antibiotika- und Na-Thioglykolat-Zusatz.

Diese Art der Züchtung gelingt jedoch nicht immer; zumindest eignen sich derartige Nährböden nicht für die Kulturhaltung über einen längeren Zeitraum.

SHAFFER (1952) konnte eine quantitative Beziehung zwischen den Bakterienzellen und dem Amöbenwachstum in dem S.-F.-Nährboden feststellen. Er konnte nachweisen, daß für die Vermehrung von E. histolytica essentielle Faktoren in den Bakterienzellen oder auf ihnen enthalten waren. Bei der Erforschung der Frage, wie die Amöben diese Materialien von den Bakterien erhalten, beobachteten SHAFFER et. al. (1958), daß die Bakterien, die die Vermehrung der Amöben in dem S.-F.-Nährboden aufrechterhalten, runde Körper produzieren unter dem Einfluß des Penicillin G, wie es routinemäßig in dem Nährboden verwendet wird, und daß diese runden Körper von den Amöben einverleibt werden. MELENEY berichtet, daß in einem modifizierten S.-F.-Nährboden Bakterienzellen in den Trophozoiten nachgewiesen werden konnten. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachteten SHAFFER & KEY (1960), daß die Amöben in dem modifizierten S.-F.-Nährboden Bakterienzellen wie runde Körper sich einverleibten. Aber auch die Bakterienleiber eines Stammes, der die Vermehrung der Amöben nicht förderte, wurden einverleibt. Die Autoren folgerten daraus, daß die Einverleibung eines Partikels nichts darüber aussagen kann, ob dieses Partikel nützlich für die Amöben ist.

Außer den durch Antibiotika inaktivierten Bakterienzellen, sind auch durch Bestrahlung inaktivierte Bakterien in der Lage das Wachstum von E. histolytica in der Kultur zu fördern (REEVES et. al., 1960).

4. Die Bakterien könnten durch die Produktion geeigneter physikalischer Bedingungen mit einem n i e d e r e n R e d o x p o t e n t i a l das Wachstum der Amöben fördern.

Über die Bedeutung eines bestimmten niederen Redoxpotentials für die Vermehrung der Amöben wurde bereits berichtet. JACOBS (1950) hat die E_h-Werte in Kulturen, der verschiedensten Bakterienarten, die das Wachstum von E. histolytica-Kulturen in

unterschiedlichem Maße beeinflussen, gemessen, um herauszufinden, ob irgend eine Beziehung zwischen diesen Werten, der Art der begleitenden Bakterien und dem Grad der Vermehrung der Amöben besteht. Die niedrigsten E_h-Werte wurden erreicht mit Bacterium coronafaciens, Bact. subtilis, Streptococcus haemolyticus, Organismus't' und Clostridium welchii (-114, -120, -250, -350, -300 mV). Wenn ähnliche Messungen in Gegenwart von E. histolytica durchgeführt wurden, änderten sich die Werte nicht wesentlich. Gleichzeitig wurden Zählungen der Amöben durchgeführt. In den Kulturen mit Organismus't' wurde die rascheste Vermehrung 24 bis 48 Stunden nach der Inokulation beobachtet. In dieser Zeit waren auch die E_h-Werte höher als in der Bakterienkultur ohne Amöben. In Kulturen mit Clostridium welchii wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. Mit den anderen drei Bakterienarten konnte jedoch nur ein geringes Wachstum der Amöbenkulturen erzielt werden. Strenge Beziehungen zwischen dem E_h-Wert und der Amöbenpopulation konnten nicht erwiesen werden. Wie in dem Kapitel über das Redoxpotential bereits berichtet wurde, vermehrt sich E. histolytica innerhalb weiter Grenzen des Redoxpotentials. So geben diese Versuche auch keinen Aufschluß darüber, ob die E_h-Werte als solche das Wachstum beeinflußen oder ob es andere Faktoren sind, die sicherlich mitspielen. So könnten im Organismus't' und Clostridium welchii gemeinsame Wachstumsfaktoren enthalten sein, die die Vermehrung von E. histolytica günstig beeinflussen. NAKAMURA (1952) hat untersucht, ob der wachstumsfördernde Einfluß von T. cruzi, nicht durch die Bildung eines entsprechenden Redoxpotentiales zu erklären sei. Dem Nährboden wurde das reduzierende Thioglykolat hinzugefügt, und um den Sauerstoff fernzuhalten, wurden die Amöben-Trypanosomen-Kulturen mit Paraffin abgedeckt. Zur Untersuchung, ob Thioglykolat oder die Paraffinschicht notwendig war, die anaeroben Bedingungen zu garantieren, wurde in weiteren Kulturen einmal der Thioglykolatzusatz, dann die Paraffinabdeckung und einmal beides weggelassen. Als Redoxindikator wurde Methylenblau hinzugefügt. In den Kulturen mit Thioglykolat und der Paraffinschicht war das Wachstum gut, und die Farbe des Methylenblau blieb unverändert. Wenn Thioglykolat oder die Paraffinschicht weggelassen wurde, ließ die Vermehrung nach, und in dem oberen

Teil des Nährbodens blieb das Methylenblau nicht reduziert. Wenn beides, Thioglykolat und die Paraffinschicht, weggelassen wurden, war das Wachstum gering, und Methylenblau blieb im ganzen Nährboden nicht reduziert. Es wurde gefolgert, daß die Hauptaufgabe der Trypanosomen die Lieferung von Wachstumsfaktoren sei, weniger die Produktion eines niederen Redoxpotentials. HARINASUTA (1955) beobachtete bessere Ergebnisse in der Züchtung von E. histolytica, wenn dem Nährboden vor der Inokulation der Amöben große Mengen gewaschener Bakterien hinzugefügt wurden. Das Redoxpotential wurde durch diese Bakterien rasch gesenkt, wodurch die anaeroben Bedingungen geschaffen wurden, die von den Amöben benötigt werden.

Anaerobe Bedingungen mit einem niederen Redoxpotential könnten jedoch auch durch den Zusatz eines Reduktionsmittels geschaffen werden. Dennoch muß der Versuch, die begleitenden Bakterien durch ein Reduktionsmittel zu ersetzen, an der Zahl der Wachstumsfaktoren, die von den Bakterien geliefert werden, scheitern.

Die Verwendung zusammengesetzter Nährböden mit ihrer monobakteriellen Begleitflora der verschiedensten Stämme oder gar mit einer Mischflora bringt so viele unbekannte Faktoren mit sich, daß noch viele Fragen über die Physiologie von E. histolytica und die Rolle der Amöbionten offen bleiben. Die Forderung NAKAMURAS' (1953) nach vergleichenden biochemischen Studien der Bakterien, die die Vermehrung der Amöben unterstützen, dürfte den Weg weisen, auf dem die Wirkungsweise der Bakterien erhellt werden könnte.

(B) BAKTERIEN, DIE DAS WACHSTUM VON E. HISTOLYTICA IN DER KULTUR FÖRDERN

Im allgemeinen gedeihen E. histolytica-Kulturen mit einer gemischten Bakterienflora besser als solche mit einer monobakteriellen Begleitflora (BALAMUTH & WIEBOLDT, 1947; CHINN et al., 1942). Wenn es aber darum geht, Einblick in die Stoffwechselbedingugen von Amöben und Bakterien zu gewinnen, muß eine monobakterielle Begleitflora gefordert werden. Welche Bakterien sind nun in der Lage, das Wachstum der Amöben in der Kultur zu fördern?

Die erste monobakterielle Begleitflora wurde von REES et al. (1942) beschrieben. Der begleitende Bakterienstamm wurde Oranismus't' genannt.

Von CHINN et al. (1942) wurden E. histolytica-Kulturen mittels durch Mikroisolation gewonnerer Cysten mit verschiedenen monobakteriellen Begleitfloren angelegt. In diesen Studien wurden 26 Bakterienarten auf ihre Fähigkeit getestet, die für die Vermehrung der Amöben notwenigen Bedingungen in dem Locke-Ei-Reis-Nährboden zu liefern.

Bakterien, die das Wachstum der Amöben förderten:

Organismus't' (Leptotrichia buccalis)	Bacillus subtilis
Clostridium perfringens	Bacillus mesentericus
Staphylococcus aureus	Actinomyces muris
Salmonella schottmuelleri	Aplanobacter stewartii
Streptococcus haemolyticus	Bacterium coronafaciens
Streptococcus faecalis	Serratia marcescens
Streptococcus viridans	Neisseria catarrhalis

Kein Wachstum wurde erzielt mit:

Escherichia coli	Bacterium translucens
Aerobacter aerogenes	Bacterium striafaciens
Alcaligenes faecalis	Salmonella paratyphi
Staphylococcus albus	Pseudomonas aeruginosa
Proteus vulgaris	Saccharomyces cerevisiae
Brucella suis	Torula histolytica
Brucella abortus	Monilia albicans
Corynebacterium diphteriae	

Bei einer Betrachtung dieser Liste fällt auf, daß die Bakterien in ihrer Klassifizierung zum Teil weit auseinander liegen. Wie aus der Gegenüberstellung hervorgeht, können unter nahe verwandten Bakterienarten die einen das Wachstum fördern andere nicht.
Von Escherichia coli und Salmonella schottmuelleri wurde nur in einem Versuch das Wachstum gefördert.

Eine erfolgreiche Kulturhaltung mit 6 weiteren Bakterienarten wurde von CLEVELAND & SANDERS (1930) beschrieben. Sie gewannen als Ausgangsmaterial bakterienfreie Amöben aus sterilen Amöbenabszessen , die sie in der Katzenleber gesetzt hatten.
Bakterien, die das Wachstum förderten:

Bacillus niger	Escherichia communior
B. mesentericus	Vibrio comma
B. brevis	Neisseria catarrhalis

Kein Wachstum wurde erzielt mit:

Bacillus megatherium	Escherichia acidilactici
Bacillus cereus	Pseudomonas aeroginosa
Bacillus subtilis	Alcaligenes faecalis
Proteus vulgaris	

DOBELL (1947) hat E. histolytica mit einer monobakteriellen Begleitflora von Escherichia coli gezüchtet. SHAFFER & FRYE (1948) mit Streptobacillus sp..

Bei Versuchen mit penicillinresistenten Bakterienarten fand JACOBS (1950) vier, mit denen der NRS-Stamm von E. histolytica gezüchtet werden konnte:
Klebsiella pneumoniae
Eberthella typhosa
Salmonella paratyphi A
Salmonella paratyphi B
Mittels Penicillin wurde die übliche Begleitflora, der penicillinempfindliche Streptococcus haemolyticus, eliminiert.
Kein Wachstum der Kultur wurde errreicht mit:
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella enterititis
Shigella dysenteriae
Proteus vulgaris.

Bei einer Untersuchung von 65 Bakterienarten auf ihre Fähigkeit, das Wachstum von 3 Stämmen von E. histolytica zu unterhalten (F-22, 200 und 103), fand BRADNER (1953) 8 Bakterienarten, die diese Fähigkeit hatten:

Clostridium tetani
Clostridium botulinum
Clostridium pasterianium
Clostridium perfringens
Bacillus circulans
Micrococcus pyogenes var. aureus (S. aureus)
Micrococcus pyogenes var. albus
Paracolobactrum coliforme

Mit Ausnahme von Clsotridium perfringens und S. aureus waren alle bisher noch nicht als Begleitflora von E. histolytica beschrieben worden.

Vergleichende Schlüsse aus den Ergebnissen dieser verschiedenen Untersuchungen können nicht gezogen werden, da einmal verschiedene Nährböden benutzt worden sind, zum andern die Kulturen in einer Reihe von Versuchen aus Cysten, in einer anderen Reihe aus vegetativen Formen angelegt wurden. So kann an dieser Stelle nur eine Übersicht über die Bakterien gegeben werden, die das Wachstum der E. histolytica-Kulturen fördern.

Obwohl viele Organismen gefunden wurden, die die Vermehrung der Amöben fördern, sind wenig Informationen über die physiologischen Besonderheiten dieser Bakterien veröffentlicht worden. BRADNER (1953) hat die Physiologie der 8 Bakterienarten, die von ihm als Amöbionten gefunden wurden, untersucht. Die fermentative Fähigkeit jeder Bakterienart wurde untersucht, indem in einem Trypticase-Agar-Nährboden 21 verschiedene Kohlehydrate angeboten wurden. Zur weiteren biochemischen Prüfung der Stoffwechselleistungen wurden in einem anderen Nährboden die Gelatineverflüssigung, die Indol- und H_2S-Bildung, die Harnstoffspaltung u.a. untersucht. Dabei zeigte sich, daß keiner der Oganismen von den Kohlehydraten Adonitol und Dulcitol abbauen oder Indol und Acetylmethylcarbinol bilden kann. Die gefunden Stoffwechselleistungen können jedoch solange nicht als bezeichnend angesehen werden, bis nicht in einer viel größeren Zahl von Untersuchungen ähnliche Ergebnisse gefunden werden.

Tab. A

Bakterien, die als monobakterielle Begleitflora das Wachstum von E.histolytica-Kulturen fördern

A. Aus Cysten

Bakterienart:	E.hist.-Stamm	Nährboden:	Autor:
Organismus"t" (Leptotrichia buccalis) Clostridium perfringens Staphylococcus aureus Salmonella schottmuelleri Streptococcus haemolyticus Streptococcus faecalis Streptococcus viridans Bacillus subtilis Bacillus mesentericus Actinomyces muris Aplanobacter stewartii Bacterium coronafaciens Serratia marcescens Neisseria catarrhalis	Stamm 101 Stamm 102	modifizierter Boeck-Drbohlav-Nährboden (koagulierter Ganz-Ei-Schrägnährboden überschichtet mit Locke'scher Lösung und mit einem Reiszusatz.)	CHINN,B.D.,JACOBS,L.REARDON, L.V. und REES,C.W. 1942
Streptobacillus sp. E.coli communior	NRS-Stamm	modifizierte Na-Thioglykolat-Nährlösung	SHAFFER,J.G.& FRYE,W.W. 1948
unbezeichnetes anaerobes Bact. des Paracolon E. coli communior	NRS-Stamm	Eigelbaufguß-Nährboden	BALAMUTH,W. & WIEBOLDT, W.L. 1947
Aerobacter aerogenes A. cloacae Proteus vulgaris Kurthia zenkeri } fraglich			

Tab. XI

B. Aus vegetativen Formen:

Bakterienart:	E.hist.-Stamm	Nährboden:	Autor:
Bacillus niger Bacillus mesentericus Bacillus brevis Escherichia communior Vibrio comma Neisseria catarrhalis	keine Angabe	Leberaufguß-Agar-Nährb.	CLEVELAND,L.R. & SANDERS,E.P. 1930
Escherichia coli	mit verschied. Stämmen		DOBELL,C. 1947
Klebsiella pneumoniae Eberthella typhosa Salmonella paratyphi A Salmonella paratyphi B	NRS-Stamm	LER-Nährboden	JACOBS,L. 1950
Clostridium tetani Clostridium botulinum Clostridium pasterianium Clostridium perfringens Bacillus circulans Micrococcus pyogenes var.aureus Micrococcus pyogenes var. albus Paracolobactrum coliforme	F-22(wuchs nicht) Stamm 200 Stamm 103	Leberaufguß-Agar-Nährb.	BRADNER,W.T. 1953

C. ZÜCHTUNG VON E. HISTOLYTICA MIT HÄMOFLAGELLATEN

Die erste bakterienfreie Kulturhaltung von E. histolytica über unbeschränkte Zeit gelang PHILLIPHS (1950) durch das Ersetzen der Bakterien durch T. cruzi. Die Trypanosomen sind also in der Lage, den Amöben die Wachstumsbedingungen zu liefern, die sonst von der bakteriellen Begleitflora geschaffen werden. Es hat sich jedoch gezeigt, daß nach langer Kulturhaltung ein sonst höchst virulenter E. histolytica-Stamm seine Virulenz verliert. Nach Versuchen von PHILLIPS & BARTGIS (1954) erzeugten die Amöben nach 1 - 3wöchiger Züchtung mit T. cruzi noch typische Ulcerationen im Meerschweinchendarm. Von der 5. Woche an nahm die Virulenz jedoch ab, bis die Amöben nach 8 Wochen nicht mehr invasiv waren. Die Virulenz konnte jedoch wieder erlangt werden, sobald die Amöben wieder mit Streptobacillen oder Clostridien gezüchtet wurden. Dieser interessante Versuch zeigt, daß die begleitenden Bakterien nicht, wie vielfach vermutet wurde, direkt in der Pathogenese der Amöbenruhr wirken, da die Amöben ja auch ohne Bakterien nach einer 3wöchigen Züchtung mit T. cruzi noch virulent waren. Die Tatsache aber, daß die Amöben nach 5-wöchiger Züchtung ohne Bakterien avirulent wurden, die Virulenz aber wiedererlangten, sobald sie wieder einige Zeit zusammen mit Bakterien gezüchtet worden waren, zeigt, daß die Bakterien durch einen direkten Einfluß auf die Amöben selbst einen Wechsel in deren Virulenz herbeiführen.

Bei der Testung von 6 Arten von Hämoflagellaten, L. donovani, L. tropica, L. brasiliensis, Strigomonasfasciculata, T.conorhini, T. pipistelli und T. cruzi durch PHILLIPS (1951) war nur T. cruzi in der Lage, das Amöbenwachstum zu unterhalten. Hierzu im Gegensatz zeigten die Untersuchungen von PAN (1960), daß auch andere Hämoflagellaten in der Lage sind, bei entsprechenden Bedingungen das Amöbenwachstum zu fördern. In einem oben beschriebenen Spezialnährboden gelang es PAN, E. histolytica zusammen mit T. lewisi, L. donovani, L. brasiliensis, L. enriettii und E. schaudinni zu züchten. Aber auch in diesem Nährboden waren die Ergebnisse der E. histolytica-T. cruzi-Kombination besser.

In gleicher Weise, wie bei der Züchtung von E. histolytica mit Bakterien eine zu starke Vermehrung letzterer durch die Bildung saurer Stoffwechselprodukte das Amöbenwachstum hemmt, wurde nach den Untersuchungen von PHILLIPS (1962) in der Amöben-Trypanosomenkultur ein besseres Wachstum der Amöben bei einer niederen Konzentration der Trypanosomen erzielt, da der p_H-Werte gesenkt wird. Optimale Wachstumsbedingungen waren in den Amöben- Trypanosomenkulturen gegeben bei 8-30 Mill/ml Trypanosomen.

D. REINKULTUREN

Bei der Züchtung der Entamoeben in Reinkulturen stellt sich zunächst einmal die Aufgabe der Elimination der Bakterien. Dazu kommt als Zweites das Problem der Substitution der von den Bakterien gelieferten Faktoren, die für das Amöbenwachstum erforderlich sind.

Zur Elimination der Bakterien sind verschiedene Wege beschritten worden:

Es können durch Isolation mit einer Mikropipette bakterienfreie Cysten gewonnen werden. Diese Methode ist von REES (1939) und von REES et al. (1941) beschrieben worden.

Auch durch Waschen und Desinfektion wurden Cysten bakterienfrei gemacht (MELENEY et al., 1940; BALAMUTH & WIEBOLDT, 1947 und 1951; RAO, 1951).

Zur Gewinnung steriler vegetativer Formen eignet sich die Methode von CLEVELAND & SANDERS (1950). Sie haben die Amöben aus sterilen Leberabszessen isoliert, wie oben bereits berichtet wurde.

Von einer Penicillin-empfindlichen Begleitflora können die Amöben durch einen Penicillinzusatz befreit werden (JACOBS, 1950).

Eine sehr einfache Methode wird von BRADNER (1953) angegeben. Durch Erhitzen auf 50°C. werden in der Phillips-Kultur die Amöben von den Trypanosomen befreit.

In dem Versuch, die Bakterien zu ersetzen, sind verschiedene Substrate getestet worden, einschließlich durch Erhitzen inaktivierter Bakterien, Bakterienfiltrate und verschiedener flüssiger Nährlösungen, denen gewisse Wachstumsfaktoren beigefügt wurden.

SNYDER & MELENEY (1941) haben gefunden, daß bakterienfreie Cysten in einem sterilen Nährboden excystieren, wenn reduzierende Substanzen in Form von Cystein und neutralisierter Thioglycolsäure hinzugefügt werden. Zu einer Kulturhaltung der excystierten Amöben genügt jedoch die Herstellung eines niederen Redoxpotentials nicht. Dazu muß die ganze Reihe der Wachstumsfaktoren die von den Bakterien geliefert werden, substituiert werden. SHAFFER & FRYE (1948) berichteten über

die Züchtung des NRS-Stammes von E. histolytica in einem Nährboden, der einen erhitzten, antibiotisch behandelten NRS-Bakterienkomplex enthielt. Bei einer Überimpfung alle 48 Stunden gelang es, die Kultur über 100 Generationen aufrecht zu erhalten. Bei dem Nährboden handelt es sich um einen Routine-Ei-Schrägnährboden mit gepufferter Salzlösung, die überschichtende Flüssigkeit bestand aus 10 %igem normalen Pferdeserum mit Reismehlzusatz. Nachdem die Autoren festgestellt hatten, daß unter gewissen Bedingungen der aus dem NRS-Bakterienkomplex isolierte gramnegative, anaerobe Streptobacillus die Vermehrung des NRS-Stammes von E. histolytica ausgezeichnet unterhält und von SNYDER & MELENEY (1943) ein flüssiger Thioglykolatnährboden beschrieben worden war, der diesen Streptobacillus als Begleitflora enthielt, wurde von SHAFFER, RYDEN & FRYE (1948) der Versuch gemacht, ob das Streptobacillus nicht nach einer 24stündigen Züchtung in dem Thioglykolatnährboden entfernt werden könnte, nachdem es möglicherweise die erforderlichen Wachstumsbedingungen für die Amöben geschaffen hatte. Zu diesem Zwecke wurde die überschichtendeFlüssigkeit einer Streptobacillenkultur zentrifugiert, und die Bakterien, die nicht abgesondert werden konnten, wurden durch Penicillin gehemmt. Zusammen mit einem bakterienfreien Filtrat des NRS-Bakterienkomplexes wurde so mit Pferdeserum und physiologischer Kochsalzlösung ein Nährboden ohne ein nachweisbares Bakterienwachstum hergestellt. Das Ergebnis war positiv.

Es ergeben sich die Möglichkeiten, daß die Bakterien irgendwelche Stoffwechselprodukte hinterlassen oder physikalische Bedingungen setzen, die für das Amöbenwachstum erforderlich sind, oder daß die Bakterienzellen oder Teilchen von ihnen für den Stoffwechsel der Amöben unbedingt erforderlich sind.

Ebenfalls nach dem Prinzip der vorausgehenden Herstellung der geforderten Bedingungen in dem Nährboden züchtete SAITO (1953) Bakterien über 18 - 20 Stunden auf seinem RSR-Nährboden, welcher aus einer festen Phase aus Pferdeserum und Ringerlösung überschichtet mit Ringerlösung besteht, sowie auf BALAMUTH-Eigelb-Aufguß-Nährboden, jedesmal mit einem

Reismehlzusatz. Nach dieser ersten Bebrütung wurde das Medium mit Paraffin abgedeckt und nochmals 4 - 6 Stunden bebrütet. Darauf wurden die Bakterien durch 2-stündiges Erhitzen auf 56° - 58° C. inaktiviert. Vor der Beimpfung mit Amöben wurde noch Pferdeserum (1/10 des Nährbodens), Streptomycin und Penicillin hinzugefügt. In beiden Nährböden wuchs E. histolytica schnell, ohne eine nachweisbare bakterielle Begleitflora. Wenn die Amöben dagegen auf Nährböden übertragen wurden, die nicht in dieser Weise vorbehandelt waren, war keine Vermehrung festzustellen.

Zur Züchtung von Protozoen in einer bakterienfreien Umgebung ist vielfach das lebende Gewebe benützt worden (REES et al., 1941). Über die Bildung bakterienfreier Amöbenabszesse in der Katzenleber, wie sie von CLEVELAND und SNYDER beschrieben wurde, ist schon berichtet worden. SHAFFER et al. (1953) berichteten über die Züchtung von E. histolytica in Hühnerembrionen-Extrakt ohne irgend welche anderen Mikroorganismen.

Der Nährboden nach SHAFFER et al. (1953) hatte folgende Zusammensetzung:

(a) Hank'sche Lösung;
(b) Hühnerembrionen-Extrakt, gebildet aus 10 Tage alten Hühnerembrionen, gewaschen mit (a), durch eine Spritze gepresst in Reagenzgläser und zu gleichen Teilen mit (a) gemischt; nach einer einstündigen Lagerung bei 4° C. wurden die Reagenzgläser zentrifugiert, die obere Flüssigkeit abgegossen und über Nacht tiefgekühlt, wieder aufgetaut und nochmals zentrifugiert;
(c) Nährflüssigkeit bestehend aus Hank'scher Lösung (a), Pferdeserum und Embrioextrakt (b), Penicillin und Phenolrot;
(d) Gewebssubstrat bestehend aus Hühnchenembrionen (ohne Extremitäten, Augen und dem vorderen Teil des Kopfes), die in einem Mörser zermalmt wurden und dann mit soviel Nährflüssigkeit gemischt wurden, bis eine 10 %ige Konzentration entstanden war.

In dieser Suspension wurden die Amöben unter anaeroben Bedingungen (Brewer-Kammer) bei 37° C. bebrütet.

In Suspensionen der embrionalen Leber wurde ein besseres Wachstum beobachtet als in solchen aus dem Gehirn, Muskeln oder dem Eingeweide. Die Zahl der Amöben war abhängig von der zugefügten Menge an Pferdeserum. Wenn Gewebsteile der verschiedensten Organe des Hühnerembrios in der Nährflüssigkeit herum schwammen,

penetrierten die Amöben aktiv in einige dieser Gewebsteile, besonders in Leberteile, weniger in Herzmuskelstücke, dagegen nicht in Gehirnteile und Muskelteile. In den Gewebsteilen, in die Amöben eingedrungen waren, zeigten sich keine zellulären Reaktionen um die Amöben, auch keine Anzeichen irgend welcher lytischer Tätigkeit.

Auch einer von REEVES und seinen Mitarbeitern (1957) beschriebenen bakterienfreien E. histolytica-Kultur lag die Verwendung eines Hühnerembrionen-Gewebsaftes zugrunde. Der Nährboden bestand:

(a) aus einem modifizierten S.-F.-Medium als Grundbestandteil (12 ccm) - bestehend aus Trypticase, Glucose, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, NaCl, Hefeextrakt, Thiomalonsäure, mit Natriumhydroxyd auf p_H 7,0 gebracht -;
(b) dem Hühnerembrionen-Gewebsaft (2,5 ccm), welcher hergestellt wurde aus 10 Tage alten Hühnerembrionen, die durch eine Spritze gepresst, zu gleichen Teilen mit dem Grundnährboden vermischt und zentrifugiert worden waren, wobei der obere flüssige Teil als Gewebssaft verwendet wurde.

Außer diesen beiden Hauptbestandteilen, enthielt der Nährboden noch Pferdeserum und Penicillin. Letzteres sollte die Streptococcen, die mit den Amöben aus der Stammkultur übertragen wurden, inaktivieren. Nach der 6. Kultur, konnte das Penicillin weggelassen werden, und die völlige Abwesenheit aerober und anaerober Bakterien konnte durch wiederholte Sterilitätsteste nachgewiesen werden.

In diesen Versuchen wurde gezeigt, daß ein Zusatz von Gewebsteilen des Hühnerembrios die Vermehrung der Amöben nicht förderte, doch das Gefrieren und Wiederauftauen, wie ein Erhitzen des Nährbodens auf 70°C. für 10 Minuten, hemmte das Wachstum. Daraus wurde gefolgert, daß der für das Wachstum maßgebliche Teil des Hühnerembrionen-Gewebsaftes thermolabil und partikulärer Natur sei.

Einen biphasischen Nährboden zur bakterienfreien Züchtung von E. histolytica, mit einem zellfreien Hühnerembrionenextrakt in dem flüssigen Bestandteil, beschrieb DIAMOND (1961). Als Hauptbestandteil dieses Nährbodens diente eine Nährlösung, die sowohl in der festen wie auch in der flüssigen Komponente enthalten war und sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

Tryptose (Difco)	1,00	g
Trypticase (BBL)	1,00	g
Hefeextrakt (BBL)	1,00	g
Glucose	0,50	g
l-Cysteinhydrochlorid	0,10	g

Ascorbinsäure	0,10	g
NaCl	0,50	g
KH_2PO_4	0,08	g
$K2HPO_4$	0,08	g
Aqua dest.	80 ,00	ml
Resazurin (0,05%-ig)	0,02	ml

Die feste Komponente setzte sich zusammen aus 1,6 g Agar und 80 ml der Nährlösung sowie inaktiviertem Pferdeserum (1 ml pro Reagenzglas).

Die feste Komponente enthielt in 3,25 ml der mit Aqua destillata im Verhältnis 1:4 verdünnten Nährlösung 0,05 % Agar und unmittelbar vor dem Beimpfen wurden 1,5 ml Hühnerembrionenextrakt hinzugefügt sowie 0,25 ml einer Vitaminlösung.

D I S K U S S I O N

Der einfach erscheinenden Möglichkeit, die Ernährungsanforderungen von E. histolytica aus der Liste der in den Nährmedien enthaltenen Bestandteile abzuleiten, stellen sich einige Schwierigkeiten entgegen.

Sicherlich enthalten fast alle Nährböden zum Teil Substanzen, die für das Wachstum der Amöben nicht unbedingt erforderlich sind. Dies liegt hauptsächlich an den verschiedenen Verwendungszwecken der einzelnen Nährböden und einer Wahl der Ausgangsmaterials nach vorwiegend kommerziellen Gesichtspunkten.

Nach ihrem A n w e n d u n g s b e r e i c h geordnet gliedern sich die E. histolytica-Nährböden in vier Gruppen auf:

Verhältnismäßig einfache Nährböden werden häufig zur Diagnostik herangezogen, also zur Anreicherung der Amöben aus den Stuhlproben von Patienten. Maßgeblich sind neben der Voraussetzung für eine rasche Vermehrung die einfache Zubereitung und niedrige Kosten der Materialien.

Die meisten der aufgeführten Nährböden eignen sich für die Kulturhaltung über eine längere Zeit. Während sie in ihrer Zusammensetzung den Ernährungsanforderungen von E. histolytica vollauf genügen müssen, findet das Bestreben einer einfachen und billigen Zubereitung seinen Ausdruck in der vorwiegenden Verwendung von Serum, Hühnereiern und vor allem von Industriepräparaten,wie pulverförmigen Gewebsextrakten, Peptonen und ähnlichen Substanzen.

An dritter Stelle sei hier die Verwendung der Nährmedien zur Testung von Amöbiciden aufgeführt. Hierbei werden die monophasischen Nährböden bevorzugt. Dies hat seinen Grund darin, daß in den biphasischen Nährböden der feste Bestandteil durch Absorption die Konzentration der Testsubstanzen in dem flüssigen Bestandteil mindert und das zu dem noch bei den verschiedenen Amöbiciden in unterschiedlichem Maße, so daß dann Vergleiche nicht mehr möglich sind.

Eine weitere Gruppe bilden die Nährböden, die speziell zum Studium der Physiologie von E. histolytica entwickelt worden sind. Hier ist einmal die Reihe der Medien einzuordnen, in denen Substitutionsversuche der sonst obligatorischen bakteriellen Begleitflora gemacht wurden. Zum andern gehören

Abb.5 DIE ERNÄHRUNGSANFORDERUNGEN VON ENTAMOEBA HISTOLYTICA (I)

PROTEINE | NUKLEOPROTEIDE | LIPIDE (Sterine (Cholesterin), Phosphatide (Lecithin)) | VITAMINE | KOHLEHYDRATE | MINERALIEN ANORGANISCHE SALZE

Biphasische Nährböden:

Feste Komponente		Flüssige Komponente
Ei		Eiweiß in Salzlösung
		Leberextrakt in Salzlösung
		Nährbouillon
		Lockesche Lösung
Serum		Eiweiß in Salzlösung
		Pferdeserum in Salzlösung
		Blut in Salzlösung
Agar +	Asparagin	Serum in Salzlösung
		Blut in Salzlösung
	Leber	Serum in Salzlösung
	Leber + Hühnerei	Serum in Salzlösung
	Gewebsextrakt	Salzlösung
	Blut	Salzlösung

Reisstärkezusatz

Abb.6 DIE ERNÄHRUNGSANFORDERUNGEN VON ENTAMOEBA HISTOLYTICA (II)

PROTEINE | NUKLEOPROTEIDE | LIPIDE (Sterine (Cholesterin), Phosphatide (Lecithin)) | VITAMINE | MINERALIEN ANORGANISCHE SALZE | KOHLEHYDRATE

MONOPHASISCHE NÄHRBÖDEN aus natürlichen Produkten:

- Pferdeserum oder menschliches Serum in Salzlösung
- Blut in Salzlösung
- Nährbouillons mit Rindfleischextrakt, Leberaufguß, Herzmuskelpräparat, Peptone und Eigelb in verschiedenen Kombinationen
- Embrionalflüssigkeit: aus Hühnerembrionen und in Form von Fruchtwasser
- Seröses Exsudat

Synthetische Nährböden:

Aminosäuren	Nukleinsäuren	Cholesterin	Vitamine des B-Komplexes	Anorganische Salze Mineralien in Spuren

Reisstärkezusatz

zu dieser vierten, für diese Arbeit besonders aufschlußreichen Gruppe diejenigen Medien, die speziell zum Studium der Ernährungsanforderungen von E. histolytica entwickelt wurden.

Eine Übersicht über die bisher entwickelten Nährböden wird in Tabelle 1 bis 6 gegeben.

Die Untersuchung der E r n ä h r u n g s a n f o r d e r u n g e n läßt bei einer Gegenüberstellung der gemeinsamen Bestandteile aller Nährböden sechs Fraktionen als die wesentlichen Träger des Wachstums erscheinen (HANSEN & ANDERSON, 1948).

1. Proteine
2. Nukleoproteide
3. Lipide
4. Kohlehydrate
5. Vitamine
6. Mineralien und anorganische Salze

Die essentiellen Bestandteile dieser Gruppen sind größtenteils bekannt. Sie sind in den sogenannten synthetischen Nährböden aufgezeigt worden und wurden unter dem Begriff der Wachstumsfaktoren gesondert aufgeführt.

Die beiden Schemata über die Ernährungsanforderungen von E. histolytica bringen eine Übersicht darüber, in welcher Form diesen Entamöben die zu ihrem Wachstum in der Kultur erforderlichen Aufbaustoffe angeboten werden (Abb. 5 und 6).

Bei den biphasischen Nährböden werden die oben aufgeführten sechs Stoffgruppen einmal in der festen Komponente im Ei, Serum und dem Agar-Gewebsextraktgemisch angeboten, zum andern sind aber meist auch alle für die Amöben lebensnotwendigen Substanzen in der flüssigen Komponente enthalten, wie aus den beiden Schemata zu ersehen ist. Die Amöbenkulturen wachsen zwar auf einem Eischrägnährboden, der lediglich mit einer Locke'schen Lösung überschichtet ist (REARDON & REES, 1939), jedoch wird ein besseres Wachstum erzielt, wenn in der flüssigen Komponente ebenfalls Eiweiß enthalten ist.

Die Reisstärke als Kohlehydratquelle bringt den Vorteil mit sich, daß sie von der Begleitflora in viel geringerem Maße abgebaut wird als zum Beispiel die Glucose, deren Zusatz eine rasche Säuerung ergibt. Im Vergleich mit anderen

Stärkearten hat sich die Reisstärke als am besten geeignet erwiesen und dient deshalb routinemäßig als Zusatz in den meisten E. histolytica-Nährböden. Die wachstumsfördernde Wirkund der Reisstärke wird jedoch übertroffen durch Reispuder oder auch Reismehl. Die bei dem Zusatz letzterer erzielten größeren Amöbenpopulationen werden auf den höheren Gehalt leicht wasserlöslicher Kohlehydrate, den höheren Cholesterin- und Fettsäuregehalt und den größeren Gehalt an Stickstoffverbindungen zurückgeführt. Von Bedeutung sind vor allem die in der Hüllschicht der Reiskörner enthaltenen wasser- und fettlöslichen Vitamine, die im Reispuder mit enthalten sind.

Wie die Untersuchungen der fermantativen Leistungen der Amöben gezeigt haben, sind die Amöben selbst in der Lage, die Stärke zu hydrolysieren, wobei die von den Amöben gebildeten Fermente in das Medium, auch in die feste Komponente, diffundieren. Mit Sicherheit nachgewiesen wurden eine Amylase und eine Maltase.

Der Glucosebedarf von E. histolytica ist sehr unterschiedlich beurteilt worden. Verschiedene Autoren konnten keinen Abbau der Glucose durch diese Amöbe nachweisen. Es wurde angenommen, daß E. histolytica Produkte des Glucosestoffwechsels der Bakterien verwendet. In neueren Untersuchungen konnten jedoch die wichtigsten Enzymsysteme der Glycolyse in E. histolytica nachgewiesen werden.

Als Wachstumsfaktor wurde bei Untersuchungen von Bestandteilen der Nährböden eine hitzebeständige, dialysierbare Substanz aus der proteinfreien Fraktion des menschlichen Serums nachgewiesen. Auch Erythrozyten vom Pferd und Hämoglobin zeigten amöbenstimulierende Wirkung.

Von den getesteten reinen Wuchsstoffen wurden in großen Reihenuntersuchungen 15 aliphatische Amine mit wachstumsfördernder Wirkung gefunden. Außerdem stimulierten das Wachstum: Ribose - 5 - phosphat, d-Glucosamin, das in den Amöben reichlich enthalten ist, Asparagin als Amid der Asparaginsäure, dessen Bedeutung im Stoffwechsel in dem Transport der NH_2-Gruppe liegt, Malonsäure und Fumarsäure als Abbaustufen im Zitronensäurezyklus, Oxalessigsäure als Ausganssubstanz des Zitronensäurezyklus

i-Inosamin und Cholin, das in der Transmethylierung als Lieferant von "C1-Körpern" eine Rolle spielt. Unter den Metaboliten des Nukleinsäurestoffwechsels zeigten die Purinbasen und Pyrimidinbasen einen essentiellen Charakter. In der Fraktion der Lipide erwies sich bei den Sterinen das Cholesterin als höchst wirksam sowohl auf das Wachstum wie auch auf die Virulenz dieser Entamöbe; auch das im Eigelb enthaltene Phosphatid Lecithin wirkte stimulierend.

Bei den Vitaminen sind es vor allem die Vitamine des B-Komplexes, sowie Ascorbinsäure, Ca-Pantothenat, Folsäure bzw. Leucovorin, die in den Nährböden vorhanden sein müssen.

Die wasserstoffübertragenden Fermente DPN und TPN, das Zellhaemin Cytochrom C, die Co-Transacetylase Coenzym-A und das ATP als Energieüberträger, sowie die Adenylsäure als Baustein des ATP werden ebenfalls unter den Wachstumsfaktoren aufgeführt.

Unter den p h y s i k a l i s c h e n B e d i n g u n g e n der E. histolytica-Nährböden hat besonders das Redoxpotential großes Interesse erregt. Zahlreiche Autoren haben strenge anaerobe Bedingungen in den E. histolytica-Medien als obligatorisch angenommen. Es hat sich jedoch gezeigt, daß sich E. histolytica innerhalb weiter Grenzen des Redoxpotentials vermehren kann. Die größten Amöbenpopulationen werden allerdings bei geringen negativen Eh-Werten gefunden (bis -150 mV). Bei virulenten Stämmen liegt das Wachstumsoptimum offenbar bei höher negativen Werten.

Die bisherigen Untersuchungen der Rolle der A m ö b i o n t e n in den E. histolytica-Kulturen zeigen im wesentlichen vier Möglichkeiten auf, in welcher Weise die obligatorische Begleitflora das Amöbenwachstum fördern könnte (Abb. 7):

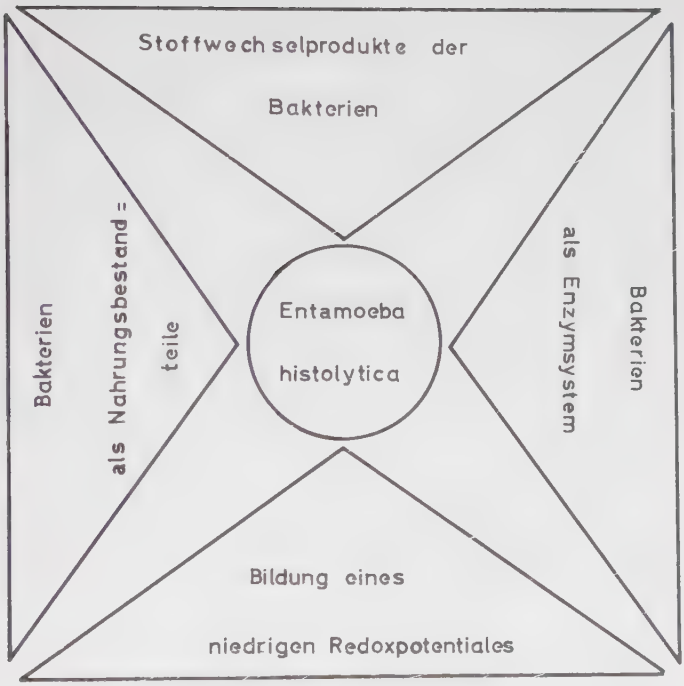
1. Ein Stoffwechselprodukt, das von den sich vermehrenden Bakterien in die Nährlösung freigesetzt wird, könnte als Wachstumsfaktor dienen.
2. Die Bakterienflora könnte ein Enzymsystem darstellen, welches von den Amöben gebraucht wird, um Nahrungsstoffe aus dem Nährboden verwerten zu können.

3. Die Bakterienzellen dienen möglicherweise den Amöben als Nahrung.
4. Die Bildung anaerober Bedingungen mit einem niederen Redoxpotential durch die Bakterien, könnte von wesentlichem Einfluß auf die Amöbenpopulationen sein.

Als Stoffwechselprodukte der Bakterien, die das Amöbenwachstum fördern, werden einmal hydrolytische Spaltprodukte der Nahrungsstoffe diskutiert, vor allem ist aber bei dem hohen Vitamin-B-Bedarf der Amöben sicher die Vitamin-B-Bildung der Bakterien von Bedeutung. Wenn die Bakterien bestimmte Stoffwechselleistungen übernehmen und die Amöben ihrerseits Metaboliten des Bakterienstoffwechsels aus dem Nährboden aufnehmen, so hat das sicher seinen Grund darin, daß bestimmte Enzymsysteme in E. histolytica fehlen. Ein solches von der Bakterienflora geliefertes Enzymsystem ist die Succinodehydrogenase und andere noch nicht im einzelnen nachgewiesene Enzyme des Glucosestoffwechsels. Die Phagozytose der Bakterienzellen durch die Amöben ist eine Möglichkeit in den Besitz der Wuchsstoffe und etwa benötigter Metaboliten des Bakterienstoffwechsels zu gelangen. Die vierte Möglichkeit, die Bildung eines niederen Redoxpotentials durch die Bakterien, würde eine Begleitflora nicht zu den obligatorischen Forderungen machen, da auch anaerobe Verhältnisse durch einen Zusatz reduzierender Substanzen gewährleistet werden.
Bei einer Aufgliederung der Amöbionten nach ihrer Systematik zeigt sich, daß der wachstumsfördernde Einfluß nicht eine Eigenschaft ganz bestimmter Gattungen ist, sondern unter den Spezies einer Gattung vermögen jeweils nur einzelne das Wachstum von E. histolytica in der Kultur zu fördern. Ebenso ist auch die Pathogenität und Virulenz der Bakterien offenbar nicht entscheidend für diese besondere Eigenschaft. Die Frage, was diesen Amöbionten gemeinsam ist und durch was sie sich im Besonderen auszeichnen, muß noch offen bleiben.

In dem Versuch, E. histolytica in der R e i n k u l t u r zu züchten, sind verschiedene Substrate getestet worden. Zu erwähnen wäre der Thioglykolatzusatz, der Zusatz durch Erhitzen inaktivierter Bakterien, von Bakterienfiltraten und bestimmten Wachstumsfaktoren. Auch der Weg einer vorausgehenden

Abb.7



Die wachstumsfördernde Wirkung der Bakterien = flora auf E. histolytica in der Kultur

Züchtung von Bakterien auf dem Amöbennährboden, mit einer Inaktivierung dieser Bakterien vor dem Beimpfen mit Amöben, wurde beschritten. Die zuverlässigsten Ergebnisse lieferten die neuerdings verwendeten Nährböden aus Hühnerembrionen-Gewebssaft, auf denen E. histolytica auch ohne den Zusatz von Bakterienzellen wuchs.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die große Zahl der zur Züchtung von E. histolytica in der Kultur entwickelten Nährböden läßt sich in zwei Gruppen einteilen, die biphasischen und die monophasischen Nährböden.

Der biphasische Nährboden besteht aus einer festen Komponente aus schräg erstarrtem Serum, Ei oder Agar mit den verschiedensten Zusätzen - wie Gewebsextrakten, Blut, Asparagin - und einer überschichtenden flüssigen Komponente in Form der Lockeschen Lösung, eines Gemisches einer Salzlösung mit Eiweiß, Leberextrakt, Peptonen, Serum oder Blut.

Die monophasischen Nährböden enthalten in einer Salzlösung Serum, Blut, Gewebsextrakte oder Eigelb. Sonderformen dieser flüssigen Medien sind der Hühnerembrionen-Gewebsextrakt-Nährboden, auf dem E. histolytica-Kulturen ohne die sonst obligatorische Begleitflora bestimmter Bakterien oder Hämoflagellaten wachsen, und die zu physiologischen Studien entwickelten synthetischen Nährböden.

2. Routinemäßig wird allen E. histolytica-Nährböden Reisstärke hinzugefügt. Die Reisstärke, die gemeinhin als Kohlehydratquelle angesehen wird, wird in ihrer wachstumsfördernden Wirkung wesentlich übertroffen von dem Reispuder, welcher einen höheren Gehalt leicht wasserlöslicher Kohlehydrate und einen höheren Cholesterin- und Fettsäuregehalt hat, mehr Stickstoffverbindungen und durch die Mitverwendung der Hüllschicht vor allem mehr wasser- und fettlösliche Vitamine enthält.

E. histolytica bildet eine Amylase und eine Maltase. Die Glycolyse erfolgt in dieser Entamöbe nicht nach dem bekannten Schema, indem offenbar der Abbau des Triosephosphats zum Pyruvat nicht erfolgen kann. Als Möglichkeit des Abbaues der Glucose zum Pyruvat wird der ENTNER-DOUDOROFF-Abbauweg angegeben. Ribose-5-phosphat kann nicht gebildet werden.

3. An Wachstumsfaktoren wurde eine ganze Reihe von Stoffen gefunden, wobei aber nur bei einzelnen nachgewiesen wurde, daß sie von den Amöben nicht gebildet werden können.

Stoffe, die das Wachstum von E. histolytica in der Kultur fördern, sind :

Vitamine des B-Komplexes
Ascorbinsäure
Ca-Pantothenat
Folsäure bzw. Leucovorin
DPN und TPN
Cytochrom C

Coenzym A	i-Inosamin
ATP und Adenylsäure	Cholin
15 aliphatische Amine	Purinbasen
Ribose-5-phosphat	Pyrimidinbasen
d-Glucosamin	Cholesterin
Asparagin	Lecithin
Malonsäure	Glucosamin
Fumarsäure	Glycoproteide
Oxalessigsäure	Phosphoproteide
Gluthathion	

4. Die größten Amöbenpopulationen wurden unter anaeroben Bedingungen und einer erhöhten CO_2-Spannung über dem Medium beobachtet. Strenge anaerobe Verhältnisse sind jedoch nicht obligatorisch für das Wachstum von E. histolytica in der Kultur.

5. Das Wachstumsoptimum von E. histolytica liegt bei pH-Werten zwischen 6,8 und 7,8. Um in Dauerkulturen die durch die sauren Stoffwechselprodukte der Bakterien rasch eintretende Säuerung des Mediums zu verhindern, müssen den Nährböden Pufferlösungen hinzugefügt werden. Im allgemeinen werden Phosphatpuffer verwendet.

6. E. histolytica kann sich ohne Begleitflora bestimmter Bakterien und Hämoflagellaten nicht vermehren.

Die Möglichkeiten der Wirkungsweise der Amöbionten auf das Amöbenwachstum sind:

(1) Einzelne Stoffwechselprodukte der Bakterien wirken als Wachstumsfaktoren.

(2) Die Bakterienflora stellt ein von den Amöben benötigtes Enzymsystem dar.

(3) Die Bakterienzellen dienen den Amöben als Nahrung.

(4) Die Senkung des Redoxpotentials in dem Medium durch die Amöbionten schafft das benötigte anaerobe Milieu und fördert dadurch das Amöbenwachstum.

7. Bisher wurden 32 Bakterienarten gefunden, die das Wachstum von E. histolytica in der Kultur fördern. Außerdem kann E. histolytica auch zusammen mit T. cruzi gezüchtet werden.

8. In dem Versuch der Substitution der Amöbionten zur Züchtung von E. histolytica in Reinkultur wurde der Nährlösung Thioglykolat, durch Erhitzen inaktivierte Bakterien, Bakterieninfiltrate und bestimmte Wachstumsfaktoren hinzugefügt. Es wurden Kulturen von Bakterien auf dem E. histolytica-Nährboden angelegt, die vor dem Beimpfen mit Amöben wieder abgetötet wurden. Der Hühnerembrionen-Gewebssaft bringt eine neue Möglichkeit der Züchtung von E. histolytica in der Reinkultur.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

BARNSTEIN,H.D.,REES,C.W. & BARTGIS,T.L. (1957) The rate of reproduction of Entamoeba histolytica in microcultures from inocula of single trophozoites in cell-free medium prepared from embryos of chick.
J. Parasitol. 43 : 143-152

BALAMUTH,W. (1946) Improved egg yolk infusion for cultivation of E. histolytica and other intestinal protozoa.
Amer. J. Clin. Path. 16 : 380-384

BALAMUTH,W. (1950) Acid phosphatase staining reaction in intestinal amoeba.
J. Parasitol. 36 (Suppl.) : 37

BALAMUTH,W. & HOWARD,E. (1946) Biological studies on Entamoeba histolytica. I. The growth cycle of population in a mixed bacterial flora.
Amer J. Trop. Med. 26 : 771-782

BALAMUTH,W. & CANDZA,J.G. (1944) Simple, standardized culture medium for physiological studies on Entamoeba histolytica.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 57 : 161-163

BALAMUTH,W. & WIEBOLDT,M.L. (1947) Comparative growth rates of Entamoeba histolytica in the presence of different bacteria.
Anat. Record. 99 : 683

BALAMUTH,W. & WIEBOLDT,M.L. (1951) Comparative growth cycles of Entamoeba histolytica with different combinations of bacteria.
Amer. J. Trop. Med. 31 : 192-205

BECKER,C.E. & GEIMAN,Q.M. (1955) Utilization of glucose by two strains of Entamoeba histolytica.
Exper. Parasit. New York 4 : 493-501

BENHAM,R.S. & HAVENS,I. (1958) Some cultural properties of Entamoeba histolytica.
J. Infect. Dis. 102 : 121-142

BIAGI,F.P.,BORLELO,E.,SERVIN,H. & MARTUSCELLI,A. (1962) The effect of cholesterol on the pathogenecity of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Prop. Med. Hyg. 11 : 333-340

BLUMENTHAL,H.,MICHAELSON,J.B. & DE LAMATER,J.N. (1954) Studies on the nutrition of Entamoeba histolytica. I. Amino acid buffers.
Exper. Parasit. New York 3 : 321-324

BLUMENTHAL,H.,MICHAELSON,J.B.,DE LAMATER,J.N. & RENNIE,P.J. (1954) Studies on the nutrition of Entamoeba histolytica II. Egg phosphate.
Exper. Parasit. New York 3 : 458-463

BOECK,W.C. & DROHLAV,J. (1925) Cultivation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Hyg.5 : 371-407

BRADIN,J.L. & HANSEN,E.L. (1948) Oxidation-reduction potential of Entamoeba histolytica in an essentially synthetic medium.
J. Parasitol. 34 (Suppl.) : 11

BRADNER,W.T. (1953) A study of the physiology of bacteria which support the growth of Entamoeba histolytica in vitro.
J. Parasitol. 39 : 326-331

CABRERA,H.A. (1958) Temperatur adaption of Entamoeba histolytica and its effect on Virulence.
Exper. Parasit. New York 7 : 276-284

CABRERA,H.A. & PORTER,R.J. (1958) Survival time and critical temperatures of various strains of Entamoeba histolytica.
Exper. Parasit. New York 7 : 285-291

*CAPOCACCIA,L. & CAO-PINNA,M. (1954) La coltivazione della Entamoeba histolytica in presenza di due sole specie batteriche.
Arch. Ital. Sci. Med. Trop. e Parasit. 35 : 55-61

CHANG,S.L. (1942) Studies on Entamoeba histolytica. I. The effect of hydrogen-ion concentration on encystation of Entamoeba histolytica in culture.
Amer. J. Trop. Med. 22 : 471-492

CHANG,S.L. (1946) Studies on Entamoeba histolytica. IV. The relation of oxydation potential to the growth, encystation and excystation of Entamoeba histolytica in culture.
Parasitology 37 : 101-112

CHINN,B.D.,JACOBS,L.,REARDON,L.V. & REES,C.W. (1942) The influence of bacterial flora on the cultivation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. 22 : 137-146

CLEVELAND,L.R. & COLLIER,J. (1930) Various improvements in the cultivation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Hyg. 12 : 606-613

CLEVELAND,L.R. & SANDERS,E.P. (1930) The production of bacteria-free amoebic abscesses in the liver of cats and observation on the amoebae in various media with and without bacteria.
Science 72 : 149

CRAIG,C.F. (1926) Observations upon the cultivation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. 6 : 333-339 u. 461-464

CRAIG,G.M. (1936) A modification of Clevelands medium for Entamoeba histolytica.
Arch. Prot. 87 : 296

MC DADE,J.J. & SHAFFER,J.G. (1959) Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica.
VI. A modification of the S-F technique which makes possible the utilization of peptone other than trypticase.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 8 : 540-545

DESCHIENS,R. (1950) La nutrition de l'amibe dysenterique.
Biologie Med. 39 : 57-91

DIAMOND,L.S. (1961) Axenic cultivation of Entamoeba histolytica.
Science 134 : 336-337

DOBELL,C. & LAIDLAW,P.P. (1926) Cultivation of Entamoeba histolytica and some other entozoic amoebae.
Parasitology 18 : 283

DOBELL,C. (1952) Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. XII. Bacterial factors influencing the live history of Entamoeba histolytica in cultures.
PARASITOLOGY 42 : 16-39

DODIN,A. (1954) Contribution àl'étude des besoins nutritifs et des conditions de culture d'"Entamoeba dysenteriae".
Med. Trop. Marseille 14 : 147-164

DOLKART,R.E. & HALPERN,B. (1958) A new monophasic medium for the cultivation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 7 : 595-596

DRYER,D.A. (1961) Growth of a strain of Entamoeba histolytica ad room temperature.
Texas Reports on Biol. & Med. 19 :393-396

ENTNER,N & HALL,N.C. (1955) Some aspects of carbohydrate metabolism of Entamoeba histolytica.
Exper. Parasit. New York 4 : 92-99

EVERRITT,M.G.,SADUN,E.H. & CAPRERA,G.M. (1953)Cultivation of Entamoeba histolytica in chick embryo.
Exper. Parasit. New.York 2 : 141-146

FRYE,W.W. & MELENEY,H.E. (1935) The cultivation of Entamoeba histolytica in erlenmeyer flasks.
Science 81 : 99-100

FRYE,W.W. & MELENEY,H.E. (1939) Liver extract as a substitute for serum in the culture medium for Entamoeba histolytica.
Science 89 : 564

GREENBERG,J.,TAYLOR,D.J. & BOND,H.W. (1955) Simple aliphatic substrates in culture on Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 4 : 1002-1005

GREENBERG,J.,TAYLOR,D.J. & BOND,H.W. (1956) Glucosamin in the culture of Entamoeba histolytica with a mixed bacterial flora.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 5 : 62-66

GRIFFIN,A.M. & MC CARTEN.W.G. (1949) Sterols and fatty acids in the nutrition of entozoic amoebae in cultures.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 72 : 645-648

GRIFFIN,A.M. & MC CARTEN,W.G. (1949) Some methods for the quantitative study of entozoic amoebae in cultures.
J. Parasitol. 35 : 193-198

GRIFFIN,A.M. & MC CARTEN,W.G. (1950) Some sources of variability in cultures of entozoic amoebae. I. The effect of age of cultures, size of inoculum and amount of starch.
J. Parasitol. 36 : 238-246

GRIFFIN,A.M. & MICHINI,L.J. (1950) Some sources of variability in cultures of entozoic amoebae. II. The effect of age of inoculum.
J. Parasitol. 36 : 247-252

GRIFFIN,A.M. & MC CARTEN,W.G. (1950) Some sources of variability in cultures of entozoic amoebae.
III. Variation in vitality.
J. Parasitol. 36 : 253-257

HALLMAN,F.A. & DE LAMATER,J.N. (1953) Demonstration of amylotic activity in cultures of Entamoeba histolytica.
Exper. Parasitol. 2 : 170-173

HALLMAN,F.A.,MICHAELSON,J.B.,BLUMENTHAL,H. & DE LAMATER,J.N. (1954) Studies on the carbohydrate metabolism of Entamoeba histolytica. I. The utilization of glucose.
Amer. J. Hyg. 59 : 128-131

*HALLMAN,F.A.,MICHAELSON,J.B.,BLUMENTHAL,H. & DE LAMATER,J.N. (1955) Cytochemical studies on Entamoeba histolytica, with particular reference to polysaccharides.
Exper. Parasit. New. York. 4 : 45-53

HALLMAN,F.A.,MICHAELSON,J.B. & DE LAMATER,J.N. (1950) The cultivation of Entamoeba histolytica in a defined medium.
Amer. J. Trop. Med. 30 : 363-369

HANSEN,E.L. (1950) A liquid medium composed of dehydrated ingredients for culture of Entamoeba histolytica associated with a single bacterium.
J. Lab. Clin. Med. 35 : 308-312

HANSEN,E.L. & ANDERSON,H.H. (1948) An essentially synthetic liquid medium for Entamoeba histolytica.
Parasitology 39 : 69-72

*HARA,K.,OKA,S.,SAWADA,T. & FUSE,M. (1954) Cytochemical observation on Entamoeba histolytica. I. On the research into enzymes and fatty substances in Entamoeba histolytica.
II. On the research into carbohydrates in Entamoeba histolytica.
Gumma J. Med. Sci. Maebashi. 3 : 249-267

*HARINASUTA,C. & HARINASUTA,T. (1955) Studies on the growth in vitro of strains of Entamoeba histolytica.
Ann. Trop. Med. & Parasitol. 49 : 331-350

HARTMAN,E. (1949) A highly efficient medium for the cultivation of Entamoeba histolytica, suitable for drug testing.
J. Parasitol. 35 (Suppl.) : 17

HARTMAN,E. (1951) Some effects of carbon dioxyde in the environment for the cultivation of parasitic protozoa.
J. Parasitol. 37 (Suppl.) : 10

HILKER,D.M.,SHERMAN,H.J. & WHITE,A.G.C. (1957) Starch hydrolysis by Entamoeba histolytica.
Exper. Parasit. New York 6 : 459-464

HILKER,D.M. & WHITE,A.G.C. (1959) Some aspects of the carbohydrate metabolism of Entamoeba histolytica.
Exper. Parasit. New York 8:539-548

HITCHCOCK,D.J. & RAWSON,G.W. (1946) The use of dehydrated coagulated egg yolk in the preparation of a medium for culturing Entamoeba histolytica.
J. Parasitol. 32 : 170-174

HOPKINS,D.L. & WARNER,K.L. (1946) Functional cytology of Entamoeba histolytica.
J. Parasitol. 32 : 175-189

INOKIS,S.,TAKADA,S. & NAKABAYASHI,T. (1953) New culture mediums for Entamoeba histolytica.
Amer. J. Clin. Path. 23 : 197-199

JACOBS,L. (1941) Oxidation-reduction potentials in relation to the cultivation of Entamoeba histolytica.
J. Parasitol. 27 (Suppl.) : 31

JACOBS,L. (1947) The elimination of viable bacteria from cultures of Entamoeba histolytica and the subsequent maintenance of such cultures.
Amer. J. Hyg. 46 : 172-176

JACOBS,L. (1950) Oxidation-reduction potential in the cultivation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. 30 : 803-815

JACOBS,L. (1947) Further studies on the maintenance of cultures of Entamoeba histolytica without viable bacteria.
J. Parasitol. 33 (Suppl.) : 20-21

JACOBS,L. (1950) The substitution of bacteria in cultures of Entamoeba histolytica.
J. Parasitol. 36 : 128-130

St. JOHN,J.H. (1932) A new medium for the cultivation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. 12 : 301-305

KARLSSON,J.L.,JAMES,M.B. & ANDERSON,H.H. (1952) Studies on nutritional principles for Entamoeba histolytica in autoclaved bacterial cells.
Exper. Parasit. 1 : 347-352

*KODAMA,T. (1953) (New media for dysenteric Amoeba) Jryo (Med. J. Nat. Hosp. & Sanatoriums of Japan) 7 : 656-660

*EL KORDY,M.I. (1944) On the cultivation of Entamoeba histolytica in hydatid fluid. J. Roy. Egypt. Med. Assoc. 27 : 329-340

DE LAMATER,J. N. & HALLMAN,F.A. (1947) Studies on culture of Entamoeba histolytica. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 65 : 26-29

LORAN,M.R.,KERNER,M.W. & ANDERSON,H.H. (1955) Cytochemical differentiation of components of Entamoeba histolytica (with special reference to variations occuring with different associated organisms). Exper. Parasit. New York 4 : 542-547

*LORAN,M.R.,KERNER,M.W. & ANDERSON,H.H. (1956) Dependence of Entamoeba histolytica upon associated streptobacillus for metabolism of glucose. Reprinted from Eper. Cell. Res. 10 :241-245

LUMBRERAS,H. (1959) Über ein flüssiges Medium zur Kultur von Balantidien, Entamoeben und Trichomonaden. Zschr. Tropenmed. u. Parasitol. 10 : 351-360

*MELENEY,H.E.,FRYE,W.W.,LEATHERS,W.S. & SNYDER,T.L. (1940) The sterilization of the cysts of Entamoeba histolytica with preliminary observation on subsequent excystation. Proc. Third Internat. Cong. Microbiol. S.140

MICHAELSON,J.B.,DE LAMATER,J.N. & TALPIS,L. (1953) Comparison of starches used in the culture of Entamoeba histolytica. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 2 : 219-226

MIGNANI,E. & BAKER,J. (1961) Studies sulla biologia di Entamoeba histolytica. V. Osservazioni sull'attivita enzimatica di Entamoeba histolytica in cultura. Riv. di Parassit. Rome 22 : 157-164

MORETTI,G.F. & CATROS,P. (1950) Le potential d'oxydo-reduction dans les cultures d'Entamoeba dysenteriae. C. R. Soc. Biol. 144 : 1500-1503

NAKAMURA,M. (1952) Substitution of an enzyme preparation for Trypanosoma cruzi cultures of Entamoeba histolytica. Kitasato Arch. Exper. Med. 25 : 43-46

NAKAMURA,M. (1952) The significance of oxidation and reduction potentials in the cultivation of Entamoeba histolytica. Kitasato Arch. Exper. Med. 25 : 47-50

NAKAMURA,M. (1952) Attempts to exchange associated organisms in cultures of Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 38 : 83

NAKAMURA,M. (1953) Nutrition and physiology of Entamoeba histolytica.
Bact. Reviews 17 : 189-212

NAKAMURA,M. (1955) Growth factors for Entamoeba histolytica.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 89 : 680-682

*NAKAMURA,M. (1957) Effect of 4-amino-5-imidazole-carboxamide and related compounds on the growth of Entamoeba histolytica.
Canadian J. Microbiol. Ottawa 3 501-503

NAKAMURA,M. (1961) Effect of antimetabolites on the growth of Entamoeba histolytica. IV. Folic Acid Analoues.
Exper.Cell.Res. 25 : 648-653

NAKAMURA,M. & BAKER,E.E. (1956) Nutritional requirements of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Hyg. 64 : 12-22

NAKAMURA,M. & BAKER,E.E. (1956) Effect of antimetabolites on growth of Entamoeba histolytica. II Pantetheine and coenzyme A antagonst.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 92 : 723-725

NAKAMURA,M.,HRENOFF,A.K. & ANDERSON,H.H. (1953) Druf effect on the metabolism of Entamoeba histolytica, in vitro and in vivo tests of synergism.

NAKAMURA,M. & JONSSON,S. (1957) The effect of antimetabolites on the growth of Entamoeba histolytica.
I. Purine and pyrimidin analogs.
Arch. Biochemistry 66 : 183-189

NELSON,E.C. (1947) Alkoholic extract medium for the diagnoses and cultivation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. 27 : 545-552

NELSON,E.C. (1948) Lipoidal extract cultivation medium.
J. Parasitol. (Supp.Sect 2) 34 : 12

NELSON,E.C. (1949) Some observations on bitamins and antibiotics in the cultivation of Entamoeba histolytica.
J. Parasitol. 35 (Suppl.) : 17

NELSON,E.C. (1951) Agar, magnesium and phosphate in the relation to the growth of Entamoeba histolytica in extract medium.
J. Parasitol. 37 (Suppl.) : 10

NELSON,E.C. & JONES,M.M. (1955) Some factors related to Entamoeba histolytica growth on rice products in an simple medium.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 4 : 822-832

PAN,Ch. T. (1960) Studies on the monoxenic cultivation of Entamoeba histolytica with hemoflagellates.
J. Infect. Dis. 106 : 284-289

PHILLIPS.B.P. (1950) Cultivation of Entamoeba histolytica with Trypanosoma cruzi.
Science 111 : 8-9

PHILLIPS,B.P. (1951) Comparative effects of certain species of trypanosomidae on the growth of Entamoeba histolytica in the absence of bacteria.
Amer. J. Trop. Med. 31 : 290-294

*PHILLIPS,B.P. (1953) Studies on the cultivation of Entamoeba histolytica with Trypanosoma cruzi.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 56 : 1028-1032

PHILLIPS,B.P. (1953) The effect of various treatment procedures on the metabolism of Trypanosoma cruzi and on its ability to support growth of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 2 : 47-53

PHILLIPS,B.P. (1962) Further studies with Amoeba-Trypanosoma cultures.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 11 : 6-11

PHILLIPS,B.P. & REES,C.W. (1950) The growth of Entamoeba histolytica with lived and heat treated Trypanosoma cruzi.
Amer. J. Trop. Med. 30 : 185-191

PHILLIPS,B.P. & BARTGIS,I.L. (1954) Effect of growth in vitro with selected microbial associates and of encystation and excystation, on the virulence of Entamoeba histolytica for Guinea Pigs.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 3 : 621-627

PHILLIPS,B.P.,WOLFE,P.A. & BARTGIS,I.L. (1958) Studies on the amoeba-bacteria relationship in amoebiasis. II. Some aspects on the etiology of the disease.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 7 : 392

PHILLIPS,B.P.,WOLFE,P.A.,REES,C.W.,GORDON,H.A.,WRIGHT,W.H. & REYNIERS,J.A. (1955) Studies on the amoeba-bacteria relationship in amoebiasis. II. Some aspects on the etiology of the disease.
Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 4 : 675-692

MC QUAY,R.M.,Jr. (1956) Charcoal medium for growth and maintenance of large and small races of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Clin. Path. 26 : 1137-1141

MC QUAY,R.M.,Jr. (1957) Strains of small race of Entamoeba histolytica maintained in outdated blood-bank blood medium.
Proc Soc. Exper. Biol. & Med. 94 : 539-541

*RAO,V.G. (1951) 1.Culture of Entamoeba histolytica with single bacterial associates: (a) Escherichia coli; (b) Chrombacterium prodigiosum. 2.Morphological characters of Entamoeba histolytica as seen in iron-haematoxilin stained preparation obtained by the in situ coverslips technique. 4.Liver leasion in rats observed 48 hours after inoculation of cultures of Entamoeba histolytica.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 44 : 358

*RAY,H.N. & SEN GUPTA,P.C. (1954) A cytochemical study of Entamoeba histolytica.
J. indian Med. Ass. 23 : 529-533

REARDON,L.V. & REES,W. (1939) The cultivation of Entamoeba histolytica without serum.
J. Parasitol. 25 (Suppl.) : 13

REES,C.W. (1928) The infectivity and pathogenicity of a starch-fed strain of Entamoeba histolytica.
J. Parasitol. 15 : 131-134

REES,C.W. (1939) The microisolation of Entamoeba histolytica, and its cultivation with single species of bacteria.
J. Parasitol. 25(6(: 14

REES,C.W. (1949) Observation of Entamoeba histolytica in microcultures of Trichomonas foetus.
J. Parasitol. 35 (Suppl.) : 17

REES,C.W.,REARDON,L.V. & BAERNSTEIN,H.D. (1948) A biochemical approach to the problem of cultivating Entamoeba histolytica without bacteria.
J. Parasitol. 34 : 11-12

REES,C.W.,BOZICEVICH,J.,REARDON,L.V. & DAFT,F.S.(1944) The influence of cholesterol and certain vitamins on the growth of Entamoeba histolytica with a single species of bacteria.
Amer. J. Trop. Med. 24 : 189-193

REES,C.W.,REARDON,L.V. & JACOBS,L. (1941) The cultivation of the parasitic protozoa without bacteria.
Amer. J. Trop. Med. 21 : 695-716

REES,CH.W.,REARDON,L.V.,JACOBS,L. & JONES,F. (1941) Problems encountered in the growth of Entamoeba histolytica in cultures developed by microisolation.
Amer. J. Trop. Med. 21 : 567-578

REEVES,R.E.,MELEMEY,H.E. & FRYE,W.W. (1957) A modified Chaffer-Frye techinque for the cultivation of Entamoeba histolytica and some observation on its carbohydrate requirements.
Amer. J. Hyg. 66 : 56-62

REEVES,R.E.,MELENEY,H.E. & FRYE,W.W. (1957) Bacteria-free cultures of Entamoeba histolytica with chick embryo tissue juice.
Ztschr. f. Tropenmed. u. Parasit. Stgt. 8 : 213-218

REEVES,R.E.,MELENEY,H.E.,FREYE,W.W. & ISBELL,D. (1959) The cultivation of Entamoeba histolytica penicillin-inhibited bacteroides symbiosis cells. I. A Pyridoxine requirement (REEVES,MELENEY,FRYE)
Amer. J. Hyg. 69 : 25-31
II. A pantothenate requirement (REEVES,MELENEY,ISBELL)
Amer. J. Hyg. 69 : 32-37

REEVES,R.E.,SCHWEINFURTH,D.I. & FRYE,W.W. (1960) The cultivation of Entamoeba histolytica with radiation-inactivated bacterial cells.
Amer. J. Hyg. 72 : 211-217

DADUN,E.H.,KRUPP,I.M. & EVERRITT M.G. (1952) Cultivation of Entamoeba histolytica in embrionic fluids.
Proc. Soc. Exper. Biol 80 : 272-275

SAITO,M. (1950) Studies on the influence of bacterial flora upon the cultivation of Entamoeba histolytica.
Kitasato Arch. Exper. Med. 23 : 33-36

SAITO,M. (1953) Cultivation of Entamoeba histolytica without actively growing bacteria.
I. Cultivation in the preconditioned medium added with antibiotics.
Kitasato Arch. Eper. Med. 25 : 245-552

SAITO,M. (1953) Cultivation of Entamoeba histolytica without actively growing bacteria.
II. Cultivation in the medium preconditioned with pure strains of bacteria.
Kitasato Arch. Exper. Med. 25 : 253-261

SAITO,M. (1953) Experimental on the essential effect of bacterial flora upon the cultivation of Entamoeba histolytica.
Kitasato Arch. Exper. Med. 25 : 263-273

*SAWADA,T.,OSHIMA,T. & SUZUKI,I. (1953) Oxidation-reduction potentials in relation to the cultivation of Entamoeba histolytica and to the establishement of amoebic infection.
Gumma J. Med. Sci. Maebashi 2 : 127-135

SAWADA,T.,SUZUKI,T. & OKA,T. (1953) Bacterial cell components as a substitute for serum in the sulture medium for Entamoeba histolytica.
Gumma J. Med. Sci. Maebashi 2 : 137-143

SHAFFER,J.G. (1952) Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. V. Studies on the nature of some of the factors in the Shaffer-Frye medium that affect the propagation of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Hyg. 56 : 119-138

*SHAFFER,J.G. (1953) Factors affecting the propagation of Entamoeba histolytica in vitro in the Shaffer-Frye medium and in tissue-bearing substrate.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 56(5) : 1033-1047

SHAFFER,J.G. & FRYE,W.W. (1948) Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. I.Maintenance of a strain of Entamoeba histolytica through one hundred transplantants in the absence of actively multiplying bacterial flora. Amer. J. Hyg. 47 : 214-221

SHAFFER,J.G. & KEY,I. (1960) The ingestion of bacteria and of altered bacterial structures by Entamoeba histolytica in Shaffer-Frye media. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 9 : 175-179

SHAFFER,J.G.,RYDEN,F.W. & FRYE,W.W. (1948) Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. III. The growth and multiplication of two strains of Entamoeba histolytica in a transparent medium without addition of rice flour or other particularlate matter and without demonstrable bacterial growth. Amer. J. Hyg. 47 : 345-350

SHAFFER,J.G.RYDEN,F.W. & FRYE,W.W. (1949) Studies on the growth requirements of E. histolytica. IV, Further observations on the cultivation of Entamoeba histolytica and other intestinal protozoa in axcler medium without demonstrable bacterial multiplication. Some modifications and simplifications of the medium. Amer. J. Hyg. 49 : 127-133

SHAFFER,J.G.,SHULER,R.W. & KEY,I. (1958) Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. The ingestion of altered bacterial structures by Entamoeba histolytica in the Shaffer-Frye medium. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 7 : 302-308

SHAFFER,J.G.,SIENKIEWICZ,H.S. & WASHINGTON,J.E. (1953) The propagation of Entamoeba histolytica in tissue-bearing culture without accompanying bacteria or other microorganisms. Amer. J. Hyg. 57 : 366-379

SHAFFER,J.G.,WALTON,J.G. & FRYE,W.W. (1948) Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. II. Preliminary observations on the cultivation of Entamoeba histolytica in a modified thioglycollate medium. Amer. J. Hyg. 47 : 222-225

SHARMA,R. (1959) Effect of cholesterol on the growth and the virulence of Entamoeba histolytica. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 53 : 278-281

*SIMITCH,T.,PETROVITCH,Z. & CHIBALITCH,D. (1955) Choix des Milieuc de culture pour l'isolement et l'entretion d'Entamoeba dysenteriae in vitro. Arch. Inst. Pasteur d'Algérie 33 : 250-257

SNYDER,T.L. & MELENEY,H.E. (1941) The excystation of Entamoeba histolytica in bacteriologically sterile media.
Amer. J. Trop. Med. 21 : 63-69

SNYDER,T.L. & MELENEY (1943) Anaerobiasis and cholesterine as growthrequirements of Entamoeba histolytica.
J. Parasitol. 29 : 278

SPINGARN,C.L. & EDELMAN,M.E. (1947) The prolongation of the viability of cultures of Entamoeba histolytica.by the addition of streptomycin.
J. Parasitol. 33 : 416-418

SPINGARN,C.L. & EDELMAN,M.E. (1950) The effect of rice powder on the growth of cultures of Entamoeba histolytica.
Amer. J. Trop. Med. 30 : 629-634

TANABE,M. & CHIBA, E. (1928) A new culture medium for Entamoeba histolytica.
Acta Med. Keijo 11 : 221

TANABE,M. & CHIBA, E. (1938) On a new method of cultivation of dysentery amoeba.
Tokyo Iji-Shinshi, Aug., No 2586

TSUCHIYA,H. (1932) A simple culture medium for Entamoeba histolytica.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 29 : 347-348

TSUCHIYA,H. (1945) Survival time of trophozoites of Entamoeba histolytica and its practical significans in dianosis.
Amer. J. Trop. Med. 25 : 277-279

YAMAMOTO,Y. (1937) Amoebic dysentery. V. Cultivation of Entamoeba histolytica. Third report. Influence of various substances on the growth of dysenteric amoeba.
J. Oriental Med. 26 : 937-968

Die mit * bezeichneten Arbeiten konnten nicht im Original eingesehen werden.

Herrn Professor Dr. med. Ludolph Fischer danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Leitung der Arbeit. Für die Unterstützung möchte ich Herrn Diplom-Biologen Wolfram Kretschmar herzlich danken.

L e b e n s l a u f

Am 25. September 1936 bin ich, Rolf Friedrich Schlagenhauf als Sohn des Schreinermeisters Friedrich Schlagenhauf und seiner Ehefrau Rosa, geborene Maier, in Frommern/Württ. geboren.

Nach fünf Volkschuljahren besuchte ich vom Herbst 1948 bis zum Frühjahr des Jahres 1957 das Gymnasium in Balingen und legte dort, am 16. März 1957 meine Reifeprüfung ab.

Am 2. Mai 1957 begann ich mein Medizinstudium auf der Universität Tübingen. Da ich auf dem Gymnasium keinen Lateinunterricht hatte, legte ich nach der Vorbereitung in Lateinkursen der Universität, am 2. März 1959 in Reutlingen die Ergänzungsprüfung in Latein ab. Nach sechs vorklinischen Semestern in Tübingen bestand ich, am 6. April 1960 die ärztliche Vorprüfung. Zu meinem ersten klinischen Semester schrieb ich mich auf der medizinischen Fakultät der Universität Kiel ein. Nach zwei weiteren Semestern in Tübingen, studierte ich ein Semester in Freiburg. Vom Sommersemester 1962 bis zum Sommer 1963 war ich wieder auf der Universität Tübingen. Am 30. Dezember 1963 schloß ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab.